

ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI BATTERI LATTICI (LAB) ISOLATI DA FILETTI DI SPIGOLA (*DICENTRARCHUS LABRAX*) E ORATA (*SPARUS AURATUS*) CONFEZIONATI IN ATMOSFERA PROTETTIVA VERSO CEPPI AUTOCTONI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*

ANTILISTERIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM GILTHEAD BREAMS AND SEA BASSES FILLETS PACKAGED MAP AGAINST PRIMITIVE STRAINS OF LISTERIA MONOCYTOGENES

Barile M., Mormile A., Mercogliano R., Murru N.

Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Delpino 1, 80137 Napoli, Italy

SUMMARY

Listeria monocytogenes is the causative agent of listeriosis typically caused by ready-to-eat processed food that have a refrigerated shelf-life, but lightly preserved fish products also belong to a high-risk category. Aim of the work was to evaluate antimicrobial activity linked bacteriocin-producing of LAB isolated from gilthead breams and sea basses fillets packaged in modified atmospheres. Fifty-five LAB strains were screened against 21 strains of *Listeria monocytogenes*, 1 *Listeria innocua* held in the culture collection of Department of Zootechnical Sciences and Food Inspection (SIA) and submitted to antagonistic activity using the *spot on lawn* and the *agar well diffusion assay*. *Lactococcus lactis sub. lactis Sa31* was able to produce bacteriocin in agar and different broth medium. The bacteriocin man31 showed sensitivity to trypsin, pronase E and papain, inactivation at temperatures $\geq 100^{\circ}\text{C}$, bactericidal mode of action and antilisterial act, rapidly. The bacteriocin man31 caused a reduction of *L. monocytogenes* $\frac{1}{2}$ c growth about $\log_{10} > 3$ UFC/ml, when was applied on indicator strain at 20,480 AU/ml concentration, in vitro.

KEYWORDS

Lactic Acid bacteria, bacteriocin, *Listeria monocytogenes*

INTRODUZIONE

I batteri lattici (LAB) includono diversi generi di microrganismi accomunati, oltre che da caratteristiche morfologiche e biochimiche, anche da un'elevata resistenza al congelamento ed alla liofilizzazione.

Largamente utilizzati nella fermentazione degli alimenti, vari autori descrivono il loro isolamento dai prodotti della pesca freschi (19). I batteri lattici sono utilizzati per garantire la sicurezza e preservare la qualità degli alimenti.

Svolgono una forte attività antagonista nei confronti di microrganismi ad essi correlati compresi batteri alteranti e patogeni come *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Bacillus spp.*

L'effetto antimicrobico dei LAB è principalmente legato all'abbassamento del pH prodotto negli alimenti, alla competizione verso nutrienti ed alla produzione di metaboliti inibenti. (19).

Ampiamente documentata è l'azione antimicrobica mediata dalla produzione batteriocine, peptidi biologicamente attivi, sintetizzate a livello ribosomiale, capaci di sviluppare legami verso specifici siti d'ancoraggio localizzati sulle membrane cellulari. (2,13,12,21).

Per garantire e migliorare la qualità e la sicurezza microbiologica degli alimenti, l'attenzione è attualmente focalizzata verso un approccio definito di bioconservazione che attraverso

l'utilizzo di una flora microbica naturale o controllata, mira ad inibire determinati ceppi batterici e/o ad estendere la conservabilità di un alimento.

Scopo del lavoro è stato quello di isolare i batteri lattici da filetti di spigole ed orate confezionate in MAP (70% CO₂, 25% N e 5% O₂) durante la conservazione a + 4 °C e di valutare la capacità dei LAB di produrre batteriocine attive nei confronti di *Listeria monocytogenes*.

MATERIALI E METODI

Isolamento batteri lattici

La ricerca dei LAB è stata effettuata in 58 unità campionarie (UC) di filetti di orata e 63 UC di spigola, confezionati in MAP (CO₂ 70%, N 25%, e O₂ 5%), mediante allestimento di diluizioni decimali allo 0,1% in acqua peptonata e semina su M₁₇ agar (Oxoid) con lo 0,5% Glucose (GM₁₇).

Le piastre sono state incubate a 32°C per 48h, e dopo isolamento su terreno solido, i batteri lattici sono stati identificati con micrometodo API 50 CHL (biò-Merieux) (Tabella 1). *L. monocytogenes* e *L. innocua*, utilizzate come ceppi indicatori (Tabella 2) dell'attività antimicrobica prodotta dai LAB, sono state isolate dagli stessi filetti da cui sono stati isolati i LAB, utilizzando la tecnica EN/ISO 11290-1.

Sono stati inoltre utilizzati 2 ceppi di riferimento, *L. monocytogenes* ½c e 4ab provenienti del laboratorio Listeria dell'Istituto Pasteur di Parigi.

Produzione di batteriocine

La tecnica "Spot on lawn method" (22,23) è stata utilizzata per valutare la capacità di produrre sostanze di natura proteica ad azione batteriostatica/battericida nei confronti di batteri patogeni, in terreni solidi.

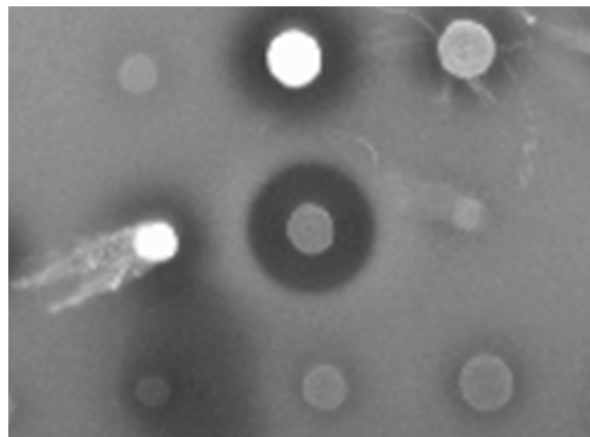
Tabella 1: Numero e specie dei LAB isolati dai filetti di spigole e orate saggiati per la capacità di produrre batteriocine

Num. ceppi	LAB	Matrice Filetti	Fonte
17	<i>Cb. piscicola</i>	orate	SIA
10	<i>Cb. piscicola</i>	spigola	SIA
2	<i>Cb. divergens</i>	orate	SIA
7	<i>Lattobacillus</i> spp.	orate	SIA
9	<i>Lattobacillus</i> spp.	spigola	SIA
5	<i>Lactococcus</i> spp.	orate	SIA
1	<i>Lactococcus lactis</i> sub. <i>lactis</i>	orate	SIA
4	<i>Lactococcus</i> spp.	spigola	SIA
55	SIA: Sezione Ispezione Alimenti Di Origine Animale		

Aloni d'inibizione netti, connessi alla produzione di batteriocine (Fig. 1) sono stati differenzia-

ti da aloni diffusi attribuibili alla produzione di sostanze acide mediante *Agar spot on method*.

Figura 1: Attività antimicrobica prodotta in GM₁₇ agar dal ceppo *Sa31* verso *L. monocytogenes* ½c



La cinetica di produzione della batteriocina, in differenti substrati di crescita (Elliker broth + 0,5% Glucose (GM₁₇), Elliker broth+ 0,5% di Lactose (LM₁₇), Brain Heart Infusion broth, Tryptone Soya broth + 0,6% Yeast extract, MRS broth) è stata valutata mediante *Agar well diffusion assay*.

La titolazione delle batteriocine in Arbitrary Units (AU)/ml è espressa come il reciproco delle diluizione più alta alla quale è possibile osservare un alone d'inibizione >1mm. L'inibizione è stata valutata nei confronti dei ceppi indicatori (Tab. n.2).

Sensibilità delle batteriocine al calore ed agli enzimi.

E' stata valutata la sensibilità della batteriocina grezza recuperata dopo centrifugazione (10.000 g per 10 min.) e filtrazione (0.45 µm Millipore low binding), al calore (60-80°C/1h; 100°C 30 min.; e 121°C per 10 min.) ed agli enzimi (tripsina, pepsina, pronase, ficina, α-amilasi, esterase, proteasi E, α-chimotripsina, proteasi K, e papaina).

Modo di azione della batteriocina

Il meccanismo d'azione nei confronti del ceppo indicatore *Listeria monocytogenes* ½c sospeso in buffer potassium phosphate pH 7.0 alla concentrazione di 1,4x10⁸ UFC/ml è stato valutato inoculando 20.480 AU/ml (massima capacità produttiva inibente) ed 5.120 AU/ml (media capacità inibente) della batteriocina grezza.

Messa in evidenza della batteriocina

La batteriocina parzialmente purificata, [recuperata dopo saturazione al 45% in ammonio solfato (salting out) del surnatante del ceppo produttore, dialisi (3500 molecular weight cut off,

Spectra por 3) e liofilizzazione] è stata esaminata utilizzando la Tricine SDS-page (20) e visualizzata direttamente con il metodo Bhunia (3).

RISULTATI

Complessivamente sono stati isolati 55 ceppi lattici (Tabella n.1). Mediante tecnica dell'Agar spot on 6 ceppi sono stati riconosciuti quali produttori di sostanze batteriocino-simili in substrati agarizzati ed inibenti la crescita dei ceppi indicatori.

L'attività è stata evidenziata dalla presenza di aloni d'inibizione di circa 5-9 mm ben distinti ed evidenti a livello dello spot del ceppo produttore

(Fig. 1).

La natura proteica dell'inibizione è stata confermata disponendo a 2 mm di distanza dal ceppo produttore, 10 µl (10 mg mL⁻¹) di soluzione con enzima proteolitico. All'Agar well diffusion solo il ceppo identificato mediante API 50 CHL (biò-Merieux) come *Lactococcus lactis Sa31*, è risultato produttore di batteriocina in brodo.

L'attività inibente della batteriocina è stata saggiata verso i ceppi di riferimento e autoctoni di *Listeria* riportati in Tabella n. 2 e titolata tra 5.120 e 320 AU/ml.

Tabella 2: Sensibilità dei ceppi indicatori autoctoni isolati dai filetti di orate e spigole alla proteina prodotta dal *L. lactis sub. lactis Sa31*

	Ceppi indicatori	Substrato	Matrice	<i>L. lactis sub. lactis Sa31</i> in GM ₁₇		Fonte
				Inibizione in mm ¹	AU/ml ^A	
1	<i>L. monocytogenes</i> ½ c	BHI	-	9	5.120	CIP
2	<i>L. monocytogenes</i> 4 ab	BHI	-	8	1.280	CIP
3	<i>L. monocytogenes</i> Sa 2	BHI	orate	8	1.280	SIA
4	<i>L. monocytogenes</i> Dl 1	BHI	orate	6	640	SIA
5	<i>L. monocytogenes</i> Sa 17	BHI	orate	5	320	SIA
6	<i>L. monocytogenes</i> Sa 30	BHI	orate	6	640	SIA
7	<i>L. monocytogenes</i> Sa 33	BHI	orate	9	1.280	SIA
8	<i>L. monocytogenes</i> Sa 38	BHI	orate	7	160	SIA
9	<i>L. monocytogenes</i> Sa 39	BHI	orate	7	640	SIA
10	<i>L. monocytogenes</i> Sa 49	BHI	orate	6	640	SIA
11	<i>L. monocytogenes</i> Sa 65	BHI	orate	6	5.120	SIA
12	<i>L. monocytogenes</i> Sa 44	BHI	orate	8	1.280	SIA
13	<i>L. monocytogenes</i> Sa 41	BHI	orate	7	1.280	SIA
14	<i>L. monocytogenes</i> Sa 54	BHI	orate	9	5.120	SIA
15	<i>L. monocytogenes</i> Sa 46	BHI	orate	6	1.280	SIA
16	<i>L. monocytogenes</i> Sa 47	BHI	orate	6	640	SIA
17	<i>L. monocytogenes</i> Sa 3	BHI	orate	5	320	SIA
18	<i>L. monocytogenes</i> Sa 4	BHI	orate	8	640	SIA
19	<i>L. monocytogenes</i> Dl 5	BHI	spigola	8	640	SIA
20	<i>L. monocytogenes</i> Dl 66	BHI	spigola	6	320	SIA
21	<i>L. monocytogenes</i> Dl 67	BHI	spigola	8	640	SIA
22	<i>L. innocua</i> Sa 1	BHI	orate	7	1.280	SIA

SIA: SEZIONE ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI; CIP: COLLEZIONE ISTITUTO PASTEUR.

¹Aloni d'inibizione espressi in mm compreso lo spot del ceppo produttore all'agar spot on

La cinetica di produzione della batteriocina in funzione della curva di crescita del ceppo *Lactococcus lactis Sa 31* (incubato a 30° in GM₁₇) ha permesso di osservare il picco massimo di produzione, pari a 5,126 AU/mL inibente la crescita di *L. monocytogenes* ½c, tra la tra la 10° e l'11° ora, ovvero tra la fine della fase esponenziale di crescita e l'inizio della fase stazionaria (1x10⁹ UFC/ml).

L'attività produttiva testata dopo inoculo del ceppo in differenti brodi (neutralizzati con soluzione 0.1 N di NaOH) è risultata massima in BHI a pH finale di 5.10 (Fig. n. 2) La batteriocina prodotta dal ceppo *Sa31* è risultata sensibile

a tripsina e papaina e completamente inattivata dopo trattamento termico. I risultati relativi all'inibizione della crescita di *Listeria monocytogenes* ½c, a due differenti concentrazioni d'inoculo sono riportate nel Grafico 1 dal quale si evince una riduzione del microrganismo a 120' dall'inoculo di 20.480 AU/ml della batteriocina, da 1,4 x10⁸ a 4,5x10⁴ UFC/ml.

La corsa elettroforetica ha messo in evidenza una banda allungata sotto i 10 KDa, responsabile, al saggio con metodo di Bhunia, della formazione di una trasparenza sulla superficie del gel ricoperto con agar seminato con *Listeria monocytogenes* ½ c.

Fig 2: Massima attività produttiva in BHI (2^{10}) inibente *L. m.* ½ c

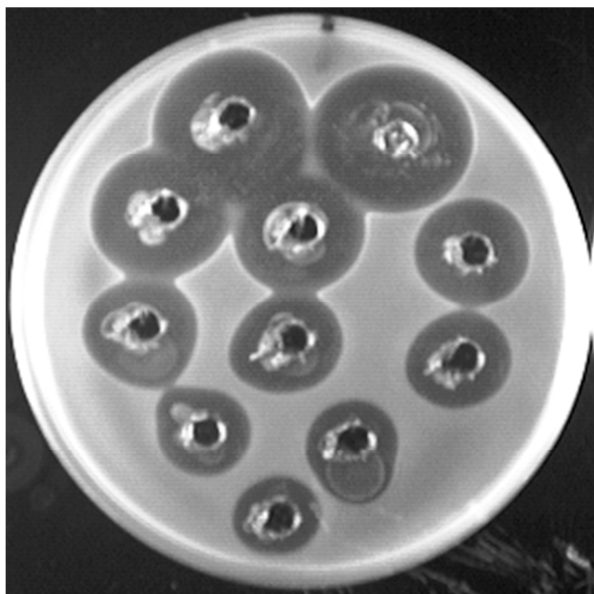
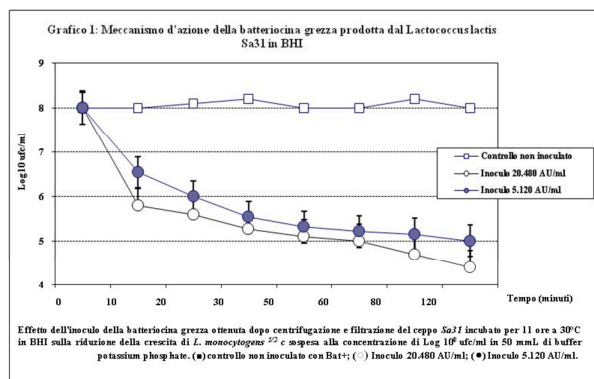


Grafico1: Meccanismo d'azione della batteriocina grezza prodotta dal *Lactococcus lactis* Sa31 in BHI



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nei prodotti confezionati in atmosfera protettiva, i LAB costituiscono una flora che aumenta in corso di stoccaggio (6) e si rende responsabile del deterioramento (18). Vari studi descrivono come questa flora sia costituita anche da batteri produttori di batteriocine la cui azione bioconservativa è ampiamente documentata. Ne sono esempi *C. divergens* V41 e *C. piscicola* V1 (riclassificato *C. maltaromaticum* da Mora et al., 2007) (16) produttori di batteriocine ad azione batteriostatica e battericida, la cui attività antimicrobica diretta da batteriocine termostabili attive contro *L. monocytogenes* è stata dimostrata sia in vivo che in vitro (4, 17). Studi analoghi a quelli portati nella presente sperimentazione hanno evidenziato, da filetti di trote allevate, ceppi (*L. lactis* USC-39, *L. delbrueckii* USC-48 e USC-50, *E. faecium* USC-46 e *E. mundtii* USC-51) produttori di batteriocine termostabili attive verso *L. monocytogenes*

LHICA 1112 e NCTC 11994 e Staphylococcus aureus LHICA 1010 (5). Nella nostra sperimentazione è stato possibile identificare un ceppo di *L. lactis sub. lactis* denominato *Sa31* produttore di una sostanza termolabile, di dimensioni <10KDa, sensibile all'azione di tripsina e papaina, con spiccata attività battericida verso ceppi di *L. monocytogenes* ½ c. Considerando lo spettro d'azione, la sensibilità al calore (inattivata dopo esposizione a temperature $\geq 100^\circ\text{C}$) e il basso peso molecolare (≤ 10 KDa) si può ipotizzare si tratti di una batteriocina di II classe (9,12). Ad oggi numerose batteriocine sono state classificate e studiate, e diversi studi riportano il potenziale applicativo di tali sostanze nella conservazione degli alimenti. La loro eterologa struttura, composizione e meccanismo di azione, rivela come la loro efficacia dipenda da un'interminabile serie di fattori. Attualmente, l'EFSA riconosce come sicura (*Generally recognized as safe* -GRAS-) la nisina, l'antibiotico di I classe prodotto dal *L. lactis sub. lactis*. Il suo utilizzo, autorizzato nell'Unione Europea dalla Direttiva 95/2/CE con sigla E234 è consentito nei formaggi fusi e stagionati, fino alla concentrazione di 500 IU/g. (7) Nessuna norma impedisce l'utilizzo di ceppi produttori di tali sostanze nella conservazione degli alimenti. Sulla base dei risultati ottenuti la proteina -man 31- ed il ceppo produttore -Sa31- potrebbero essere impiegati nella bioconservazione di alimenti che non siano sottoposti a trattamenti di pastorizzazione, sterilizzazione o analoghi, come i prodotti trasformati e/o preparati confezionati in MAP o VP, al pari della carnocina U149, carnobacteriocina A e B (17). Esempi applicativi potrebbero essere rappresentati dal salmone affumicato a freddo, per il quale la contaminazione da *L. monocytogenes* (11,8) costituisce una problematica ancora irrisolta, o dai *film antimicrobici*. (14,15,10). L'isolamento di culture lattiche autoctone dei prodotti della pesca e l'individuazione delle loro caratteristiche potrebbero contribuire alla bioconservazione alimentare ed è auspicabile una maggiore attenzione nei loro confronti.

BIBLIOGRAFIA

1. Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. 28, 169-185.
2. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1984 26 (3):328-334.

3. Bhunia A.K., M.C. Johnson and B. Ray, Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* 2 (1987), pp. 319–322.
4. Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M., & Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), 309–324.
5. Carmen A. Campos, Rodriguez O., Pilar Calo-Mata, Marta Prado, Jorge Barros-Velázquez, Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*) *Food Research International* 39 (2006) 356–364
6. Civera, T., Turi, R.M., Parisi, E. and Fazio, G. (1995). Further investigations on total volatile basic nitrogen and trimethylamine in some mediterranean teleostean during cold storage. *Scienze Alimentari*. 15:179-186.
7. Cleveland J., Montville T. J., Nes I.F., Chikindas M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation *International Journal of Food Microbiology* 71 (2001) 1–20
8. Cortesi, M., Santoro, A., Murru, N., & Pepe, T. (1997). Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10°C. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 209–214.
9. Dallas G. Hoover and Haiqiang Chen (2005) Bacteriocins with potential use in food. Cap 13 of book *Antimicrobials in food 2005* by Taylor & Francis Group, LLC.
10. Ercolini, D., Storia, A., Villani, F., & Mauriello, G. (2006). Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 765–772.
11. Jørgensen, L. V., & Huss, H. H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 127–131.
12. Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12, 39–85.
13. Lewis, C.B., Kaiser, A. & Montville, T.J. 1991 Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 1683–1688.
14. Mauriello, G., De Luca, E., La Storia, A., Villani, F., & Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 464–469.
15. Mauriello, G., Ercolini, D., La Storia, A., Casaburi, A., & Villani, F. (2004). Development of polythene films for food packaging activated with an antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 314–322.
16. Mora D., Mauro Scarpellini, Laura Franzetti, Silvia Colombo and Antonietta Galli. (2003) Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342T and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730T and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2003), 53, 675–678
17. O’Keeffe, T., & Hill, C. (2000). Bacteriocins. In Robinson (Ed.), *Encyclopaedia of food microbiology* (pp. 183–197). London Academic.
18. Paludan-Muller C, Huss HH, Gram L (1999). Characterization of lactic acid bacteria from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *Int. Journal of Food Microbiology*. 46:219- 229.
19. Pilar Calo-Mata, Samuel Arlindo, Karola Boehme, Trinidad de Miguel, Ananias Pascoal, Jorge Barros-Velazquez Current applications and future trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products *Food Bioprocess Technology* (2008) 1:43–63 DOI 10.1007/s11947-007-0021-2
20. Schagger and Von Jagow, 1987. H. Schagger and G. Von Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. *Analytical Biochemistry*. 166 (1987), pp. 369–379.
21. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Review*. 40, pp. 722–756
22. Vignolo, G., Suriani, F., de Ruis Holdano, A., P., Oliver, G. (1993). Antibiotic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 344-349.
23. Villani et al., 1993. F. Villani, G. Salzano, E. Sorrentino, O. Pepe, P. Marino and S. Coppola, Enterocin 226NWC, a bacteriocin

produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. Jour-

nal of Applied. Bacteriology. 74 (1993), pp. 380–387.