

# INTERAZIONE FLORA LATTICA-LISTERIA MONOCYTOGENES

## *LACTIC FLORA-LISTERIA MONOCYTOGENES INTERACTION*

Colombo S.<sup>1</sup>, Romani M.<sup>2</sup>, Romani C.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Corporate Director Microbiology – Merieux Nutrisciences Corporation

<sup>2</sup>Direttore scientifico Silliker Italia S.p.A.

<sup>3</sup>Tecnologa alimentare Silliker Italia S.p.A.

### SUMMARY

The EC Regulation 2073/2005 (1) requires that food processors evaluate the capability of ready-to-use (RTE) products to support the development of *Listeria monocytogenes* when their pH and aW values are favourable to the growth of this microorganism. It is renowned that the lactic flora plays an important role in many different foods, both from a technological and a food safety standpoint. This study was aimed to observe the behaviour and the potential anti-*Listeria* effect of some natural lactic flora present in Italian liver patè crostini (chicken heart and liver, anchovies, onions, capers, starch, no added preservatives) through the Combase Predictor – Max Growth Rate predictive software. The natural lactic flora of the crostini demonstrated a variable capability to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* which depends upon: the concentration of the lactic flora at the beginning of the shelf life period and the subsequent lag phase, the possible release of anti-*Listeria* substances, and the maximum growth rate.

### KEYWORDS

Lactic flora, *Listeria monocytogenes*, Maximum growth rate, challenge test, shelf life.

### INTRODUZIONE

In un recente studio (2) presentato al simposio europeo IAFP 2011 (International Association for Food Protection) a Ede (NL) in seguito a “challenge test” con *Listeria monocytogenes* inoculata nel patè per crostini toscani, sono stati individuati per la flora lattica e per *Listeria monocytogenes* il massimo valore di crescita durante la “shelf life”, i valori di “lag phase” e il “Max Growth Rate” calcolato tramite il software predittivo Combase. In base ai dati iniziali del primo studio e a quelli ottenuti nel presente studio, emerge che la flora lattica esercita un ruolo determinante nel bloccare lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*. Nel presente lavoro, articolato in quattro fasi, sono state studiate le flore lattiche tipiche del patè, selezionando quelle con attività anti-*Listeria* che sono state poi aggiunte in prodotti analoghi aventi flore lattiche naturali prive di questa caratteristica. Scopo dello studio è anche di proporre l'uso di flore lattiche selezionate per una loro aggiunta in prodotti di gastronomia potenzialmente in

grado di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*.

### MATERIALI E METODI

La guida AFSSA (3) (Agenzia Francese per La Sicurezza Alimentare) del novembre 2008 è stata adottata per la conduzione di questo studio, adattata per lo scopo e modificata come descritto successivamente. Le diverse flore microbiche sono state analizzate tramite i seguenti metodi: ISO 15214:1998 (*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C*); ISO 11290-2 e amd.2004 (*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes -- Part 2: Enumeration method*). Sistema di identificazione biochimica in galleria miniaturizzata: Crystall BBL per batteri gram positivi, API 50 CH bioMérieux per lattobacilli. Prova di diffusione radiale in agar per il test dell'attività anti-*Listeria*.

### 1° Test: valutazione della capacità di attecchimento di flora lattica .

E' stata valutata la capacità di attecchimento nel prodotto in esame di un microorganismo proveniente dall'industria casearia identificato come *Enterococcus raffinosus* (Crystall Gram+ BBL) e dotato di attività anti-Listeria. Il prodotto scelto per la prova aveva le seguenti caratteristiche:

- patè con shelf life di 30 gg, senza l'impiego di atmosfera modificata, contenente acido sorbico; il lotto aveva una concentrazione di flora lattica al tempo zero inferiore a log UFC 2. Nel prodotto non è stata rilevata presenza di *Listeria monocytogenes*.

Per l'esecuzione del test sono stati allestiti i seguenti campioni: prodotto tal quale (P); prodotto con inoculo di *Listeria monocytogenes* (PL), prodotto con inoculo di *Enterococcus raffinosus* (PE), prodotto con inoculo di *Listeria monocytogenes* e di *Enterococcus raffinosus* (PLE).

Sia l'inoculo di *Listeria monocytogenes* (circa 1.8 log UFC a t=0) che di *Enterococcus raffinosus* (circa 3.9 log UFC a t=0) , prima di essere aggiunti al patè, sono stati condizionati alla temperatura di 8° C fino al raggiungimento della fase stazionaria. I 4 campioni sono stati incubati a 8° C per 17 giorni.

Ogni giorno è stata effettuata l'analisi quantitativa della flora lattica per tutti i prodotti e di *Listeria monocytogenes* per quelli inoculati. La determinazione di pH è stata eseguita all'inizio ed alla fine del test. La determinazione di aW è stata eseguita solo all' inizio del test.

### 2° Test: studio di "shelf-life" per selezionare le flore lattiche naturali con attività anti-Listeria.

Sono stati esaminati 7 patè per crostini toscani con l'intento di selezionare e studiare le flore lattiche naturali degli stessi. Questi prodotti sono stati sottoposti alla conta della flora lattica quotidianamente e per 10 giorni. E' stato misurato il pH al tempo zero e al tempo finale.

### 3° Test: valutazione della attività anti-Listeria della flora lattica selezionata tramite diffusione in agar.

E' stata effettuata la prova di diffusione radiale in agar (4) per osservare l'attività anti-Listeria da parte delle flore lattiche selezionate. Piastre Petri da 140mm sono state inoculate con 1 ml contenente circa 10.000 UFC di *Listeria monocytogenes* prima dell'aggiunta di 50 ml di Plate Count Agar (Oxoid).

Dopo solidificazione dell'agar, sono stati scavati 9 pozzetti per piastra ognuno di 3 mm di diametro entro i quali sono stati depositati 10 µl della coltura di flora lattica sviluppatasi a 30° C per

48 ore. Le piastre sono state infine incubate a 30° C per 24 h.

### 4° Test: Allestimento del "Challenge Test" per valutare l'attività anti-Listeria della flora lattica selezionata.

Dal test precedente, sono state selezionate 2 flore lattiche (G ed L), aventi ambedue attività anti-Listeria, ma diversa velocità di proliferazione. Le suddette sono state poi impiegate come inoculo nel "Challenge Test".

L'allestimento di questo test ha avuto lo scopo di verificare la reale capacità di attecchimento delle 2 flore lattiche inoculate in un prodotto diverso dall'originale e di valutarne l'effettiva attività anti-Listeria che avevano evidenziato nella prova di diffusione radiale in agar.

Un campione di patè appartenente ad un unico lotto, contenente acido sorbico (quantità non riportata in etichetta) e con "shelf-life" di 30 giorni, è stato suddiviso in 5 unità campionarie; 2 di queste sono state sterilizzate in autoclave a 121°C per 15'. Sono stati così allestiti i seguenti test:

1. Challenge 1: Prodotto + *L. monocytogenes* 0.9 log UFC/g e flora lattica naturale 2,54 log UFC/g, entrambi a t=0.
2. Challenge 2: Prodotto con aggiunta di flora lattica L, circa 3 log UFC/g + *L.monocytogenes* 0,9 log UFC/g, entrambi a t=0.
3. Challenge 3: Prodotto con aggiunta di flora lattica, circa 3 log UFC/g + *L.monocytogenes* 1,08 log UFC/g, entrambi a t=0.
4. Challenge 4: Prodotto sterilizzato con aggiunta di flora lattica L, circa 3 log UFC/g + *L.monocytogenes* 0.9 log UFC/g, entrambi a t=0.
5. Challenge 5: Prodotto sterilizzato con aggiunta di flora lattica G, circa 3 log UFC/g + *L.monocytogenes* 0,78 log UFC/g, entrambi a t=0.

Il "challenge test" è stato eseguito secondo le indicazioni riportate nel documento AFSSA (vedi referenze) e così modificato: l'inoculo è stato eseguito con un pool di 16 ceppi di *L.monocytogenes*, anziché di 2 ceppi, a rapida crescita alla temperatura di 37°C, provenienti in prevalenza da prodotti carnei e previamente sottoposti a coltivazione a 8°C in Tryptic Soy Broth per 7 giorni per raggiungere la fase stazionaria.

Ognuno di questi campioni è stato inoculato con *L.monocytogenes* in concentrazione di 10 UFC/g al tempo zero, mentre la guida AFSSA prevede una concentrazione di 100 UFC/g di *L.monocytogenes* al tempo zero.

Le determinazioni di flora lattica, pH ed aW che

secondo la guida AFSSA vengono effettuate su campioni non inoculati, sono state rilevate dagli stessi campioni inoculati.

I prodotti dei "challenge test" 2, 3, 4, 5 sono stati inoltre addizionati con una concentrazione di flora lattica al tempo zero pari a circa 3-3.5 log UFC (tab.4). Anche questi microorganismi sono stati coltivati a 8°C in TSB per 7 gg. I 5 "challenge tests" sono stati condotti a 8°C per 11 giorni. Al decimo giorno le flore lattiche dei 5 test sono state isolate ed identificate (API 50 CH Biomerieux).

**RISULTATI**

**1° Test**

Il prodotto inoculato con *L.monocytogenes* (PL) non ha mostrato una efficace inibizione della crescita del patogeno, probabilmente per lo

scarso tasso di crescita della flora lattica. In questo caso il "growth potential" di *L.monocytogenes* è stato di 3.78 log UFC in 17 gg.

Nel prodotto inoculato con *Enterococcus raffinosus* (PE) in concentrazione pari a 3.95 log UFC/g, valore oltre 100 volte superiore alla flora naturale presente nel prodotto, al tempo zero, il microorganismo non si moltiplica nel patè. Anche il prodotto PLE, in modo simile, non ha evidenziato alcuna azione inibitrice verso *L.monocytogenes* la quale ha raggiunto al 17° giorno una concentrazione pari a circa 6 log UFC/g (4,06 + 1,87 = 5,93 log UFC/g; vedi tab.1). I valori di pH non variano durante i 17 giorni di osservazione e confermano che i microorganismi non sono in grado di produrre un'efficace attività anti-Listeria.

**Tabella 1.**

	aW	pH t=0	pH t=end	LAB t=0 (log)	LAB lag* (gg)	LAB rate* (log/gg)	L.m. lag* (gg)	L.m. rate* (log/gg)	L. mono t=0 (log)	L.m. GP 17° gg (log)
P	0,966	6,18	6,09	1,6	1,58	0,61				
PL	0,969	6,17	6,1	1,7	1,64	0,67	0,29	0,26	1,88	3,78
PE	0,965	6,19	6,08	3,95	5,24	0,72				
PLE	0,970	6,14	6,09	3,93	4,19	0,47	0,46	0,27	1,87	4,06

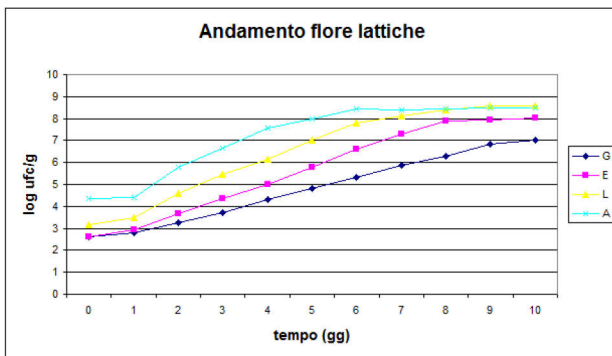
\* valori ottenuti tramite il software Combase- DMfit.

**2° Test.**

Delle 7 "shelf-life" condotte, soltanto 4 sono risultate significative (G, E, L, A,).

Il prodotto G non subisce acidificazione, la flora microbica ha un tasso giornaliero di crescita piuttosto basso e non raggiunge il valore di 8 log UFC/g. Le altre 3 flore lattiche (E,L,A) raggiungono invece tale valore tra il 5° e l'8° giorno (fig.1) e la riduzione del pH è significativa (tab.2).

**Figura 1.**



**Tabella 2.**

	Max Growth rate LAB (log/gg)	Lag phase LAB (gg)	pH t=0	pH t=end
G	0,52	0,67	6,05	6,01
E	0,82	0,78	5,9	5,56
L	0,85	0,38	6,26	5,17
A	1,02	0,71	6,03	5,19

**3° Test**

L'azione anti-Listeria delle flore lattiche G, E, L, A è stata valutata misurando gli aloni di inibizione sviluppatisi intorno ai pozzetti in agar.

**Tabella 3.** (+ = inibizione > 0,5 mm)

Ceppi L.m.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
G	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E						+		+								
L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A	+		+													

Le flore lattiche L e G mostrano la più intensa e costante attività antimicrobica nei confronti dei 16 ceppi di *L.monocytogenes* sebbene la flora G

abbia mostrato un tasso di crescita giornaliero inferiore alle altre tre (tab.2).

#### 4° test

**Tabella 4.**

	pH t=0	pH t=end	LAB UFC/g t=0 (log)	LAB UFC/g t=end (log)	MGR LAB* (log/gg)	Lag phase* LAB (gg)	GP L.m. 11° gg (log)	identificazione flora lattica al 10° giorno
Challenge 1	6,1	6	2,54	7,92	0,7	3,59	4,56	colonie grige
Challenge 2	6,12	5,64	3,15	8,34	0,95	1,11	1,95	colonie bianche L
Challenge 3	6,09	5,45	3,4	8,48	0,9	1,32	2,57	colonie bianche G
Challenge 4	6,08	5,58	3,36	8,3	1,34	1,46	2,21	colonie bianche L
Challenge 5	6,1	5,45	3,23	8,1	0,69	0,11	2,79	colonie bianche G

\*valori ottenuti tramite il software Combase - DMfit

- Confrontando i valori indicati in tab.2 e tab.4, si evince che le flore lattiche endogene (L e G) hanno nei patè naturalmente contaminati un tasso di crescita logaritmico inferiore a quello che acquisiscono una volta inoculate nel prodotto sottoposto a “challenge” (0,52 log UFC / g / die contro 0,9 log UFC / g / die e 0,69 log UFC / g / die; 0,85 log UFC / g / die contro 0,95 log UFC / g / die e 1,34 log UFC / g / die.
- le flore lattiche L e G addizionate hanno soppiantato la flora lattica naturale (tab.3), esplicando un’energica attività anti-*Listeria*, in particolare all’11° giorno di test. I profili biochimici (API 50 CH bioMérieux) e la morfologia delle colonie identificate al decimo giorno corrispondono esattamente a quelli dei ceppi inoculati.
- La riduzione del pH dal tempo zero all’undicesimo giorno è significativa per tutti i “challenge”, eccetto per il n° 1.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I test sino a qui condotti dimostrano che microrganismi di flora lattiche originati da un certo alimento mostrano difficoltà ad attecchire

in prodotti con caratteristiche chimico-fisiche diverse, pertanto la loro capacità di produrre sostanze antimicrobiche nel prodotto di origine non è da sola sufficiente a bloccare lo sviluppo di *L.monocytogenes*, se inoculati in prodotti diversi. La possibilità di attecchimento di flore lattiche isolate da alcuni prodotti ed inoculate in prodotti analoghi risulta essere invece più elevata perché probabilmente già adattate ad ingredienti e caratteristiche chimico fisiche simili.

La riduzione del pH durante la “shelf-life” e il “challenge test” è indice del raggiungimento della fase stazionaria a cui è probabilmente associata la produzione di sostanze antimicrobiche.

Il presente studio si riassume nelle seguenti attività :

- selezione di flore lattiche da prodotti analoghi a quello scelto ed individuazione, tramite l’uso di un software predittivo, della fase di latenza e del “Max Growth Rate” di ogni ceppo naturalmente presente nel prodotto;
- verifica tramite la tecnica di diffusione in agar, della attività anti-*Listeria* da parte dei ceppi selezionati;
- trapianto delle flore lattiche selezionate nel prodotto in esame e verifica della attività antimicrobica tramite esecuzione del “chal-

lenge test”;

- “fitting” delle curve di crescita di *L.monocytogenes* e delle flore lattiche tramite un software predittivo e verifica del mantenimento, da parte della flora trapiantata, dell’attività anti-Listeria originale.

La capacità della flora lattica di inibire *Listeria monocytogenes*, verificabile con “challenge test”, dipende dai seguenti fattori:

1. Concentrazione di batteri lattici all’inizio della “shelf-life”
2. Lunghezza della fase di latenza;
3. “Maximum Growth Rate”;
4. Attitudine a produrre sostanze con attività anti-Listeria.

## BIBLIOGRAFIA

1. Regolamento (CE) 2073/2005, 15 novembre 2005.
2. Romani M., Dufour C., Crociani J., Colombo S. (IAFP, European Symposium 2011). “Prediction of *Listeria monocytogenes* growth in Italian crostini liver patè - Integrated Challenge Test”.
3. Technical guidance document on shelf life studies for *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods, (AFSSA, Agence Française de Sécurité des Aliments – version 2 november 2008).
4. Paparella A., Ruocco G., Barbieri B. (Beca Spa-Budrio- BO),1992. Lattobacilli come inibitori della microflora delle carni fresche. (Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie – volume XLVI – Venezia S. Giuliano, 30 settembre, 1, 2, 3 ottobre 1992).