

Università degli Studi di Udine

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze degli Alimenti

XXIII ciclo

Tesi di Dottorato di Ricerca

***Pediococcus* spp.:**

caratterizzazione fenotipica, tecnologica e genotipica

dottoranda:

Dr Ingrid Bartolomeoli

supervisor:

Dr Michela Maifreni

anno accademico 2011/2012

Sommario

1	I BATTERI LATTICI.....	3
1.1	Il Genere <i>Pediococcus</i>.....	5
1.1.1	Il genere <i>Pediococcus</i> negli alimenti	7
1.1.2	Identificazione del genere <i>Pediococcus</i>	10
1.1.3	Applicazioni biotecnologiche	14
1.1.4	Proprietà correlate alla sicurezza d'uso e all'utilizzo come probiotici	15
2	MATERIALI E METODI	22
2.1	Identificazione del genere e della specie.....	25
2.1.1	Estrazione del DNA	25
2.1.2	Quantificazione e valutazione qualitativa del DNA	25
2.1.3	PCR specifica per l'identificazione del genere <i>Pediococcus</i>	25
2.1.4	Sequenziamento parziale del gene 16S rRNA	26
2.1.5	PCR specie-specifica	27
2.2	Caratterizzazione degli isolati.....	27
2.2.1	Caratterizzazione biochimica	27
2.2.2	Caratterizzazione tecnologica degli isolati	28
2.2.3	Valutazione degli attributi di sicurezza e dell'attività probiotica	30
2.2.4	Caratterizzazione genotipica	32
3	RISULTATI E DISCUSSIONE	36
3.1	Identificazione degli Isolati	36
3.2	Caratterizzazione biochimica e fisiologica di <i>Pediococcus</i> spp.....	38
3.2.1	Caratterizzazione biochimica	38
3.2.2	Pattern degli zuccheri fermentati	40
3.3	Caratterizzazione tecnologica	43
3.3.1	Studio delle cinetiche di crescita a differenti temperature	43
3.3.2	Studio delle cinetiche di acidificazione	47
3.3.3	Attività proteolitica	51
3.4	Caratterizzazione genotipica degli isolati	52
3.4.1	Analisi dei profili ISR-PCR	52
3.4.2	Analisi dei profili Rep-PCR	55
3.4.3	Caratterizzazione genetica mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	57

3.5	Valutazione di attributi di sicurezza	60
3.5.1	Resistenza all'acidità e alla bile	61
3.5.2	Resistenza agli antibiotici	63
3.5.3	Formazione di biofilm	65
4	CONCLUSIONI.....	67
5	BIBLIOGRAFIA	69

Premessa

I microrganismi appartenenti al genere *Pediococcus* fanno parte di un vasto gruppo microbico, quello dei batteri lattici, che riveste un ruolo di primaria importanza nel settore degli alimenti fermentati e degli alimenti contenenti probiotici.

Nonostante la presenza dei pediococchi in specifici alimenti sia ampiamente dimostrata a livello scientifico, gli studi relativi alla biodiversità fenotipica e genotipica delle specie sono molto poco approfonditi, e spesso si limitano allo studio di un solo aspetto (es. la produzione di batteriocine) in un numero molto limitato di ceppi. Le specie maggiormente studiate sono *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, per il loro ruolo svolto nelle fermentazione degli insilati e delle carni; per quanto riguarda altre specie, come per esempio *P. parvulus*, presente soprattutto nei fermentati di origine vegetale, i dati disponibili in bibliografia sono assolutamente insufficienti a definirne in maniera chiara le caratteristiche biochimiche, tecnologiche, funzionali e genotipiche.

Lo scopo di questa sperimentazione è stato quindi quello di esplorare alcuni aspetti specifici legati ai pediococchi presenti negli alimenti, al fine di aprire nuovi spiragli all'utilizzo industriale dei ceppi appartenenti a questo gruppo microbico.

INTRODUZIONE

1 I BATTERI LATTICI

I batteri lattici o LAB (Lactic Acid Bacteria) sono un gruppo molto eterogeneo di microrganismi caratterizzati dalla capacità di produrre principalmente acido lattico a partire dagli zuccheri. Questi batteri sono presenti in natura e sono largamente utilizzati nel campo delle biotecnologie, soprattutto per le loro proprietà acidificanti, aromatizzanti e probiotiche, oltre che per la capacità di inibire la microflora indesiderata o patogena negli alimenti fermentati (Lasagno *et al.*, 2002). I LAB sono indispensabili per la conservazione degli alimenti poiché fermentano gli zuccheri producendo principalmente acido lattico, che produce un effetto inibente sullo sviluppo di microrganismi alteranti o patogeni. Oltre a questo metabolita primario, i LAB producono una serie di sostanze che contribuiscono a migliorare la qualità organolettica dell'alimento, rendendolo più gradevole e digeribile, oltre che a prolungare la conservabilità (Caplice e Fitzgerald, 1999).

Agli inizi della storia della microbiologia la definizione di “batterio lattico” era un sinonimo di “microrganismo che inacidisce il latte”. A dimostrare l'importanza e la diffusione di questo tipo di microrganismi fu il fatto che il primo batterio isolato in coltura pura venne chiamato “*Bacterium lactis*” (probabilmente *Lactococcus lactis*), isolato da J. Lister nel 1873.

Un importante passo per giungere a classificare questi batteri fu fatto quando venne riconosciuta la similitudine fra i batteri che inacidivano il latte e altri LAB provenienti da habitat diversi. In ogni caso la confusione in questo settore era generale, fino a che non venne pubblicata la monografia di Orla-Jensen (1919), il quale fece una prima suddivisione in funzione della morfologia cellulare (Figura 1). Nella successiva classificazione del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology del 1986 (Sneath *et al.*, 1986) i LAB erano costituiti dai seguenti generi: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* (suddivisi in tre gruppi, omofermentanti obbligati, omofermentanti facoltativi ed eterofermentanti obbligati) (Zambonelli, 1998). I caratteri usati per classificare i microrganismi a livello di genere e specie erano basati sulla morfologia, sul tipo di metabolismo fermentativo, sulla crescita a differenti temperature, sulla configurazione dell'acido lattico prodotto, sulla capacità di crescere a diverse concentrazioni saline e sulla tolleranza ad ambienti acidi e basici. Tali caratteristiche restano un punto di riferimento anche nell'attuale classificazione dei batteri lattici, che è fondamentalmente basata sullo studio di caratteri fenotipici e biochimici; nella pratica tuttavia lo studio di queste caratteristiche può non essere sufficiente ad assegnare il genere e la specie di appartenenza. In alcuni casi gli studi di omologia DNA-DNA sono stati l'unico modo per risolvere il problema dell'identificazione (Amor *et al.*, 2007).

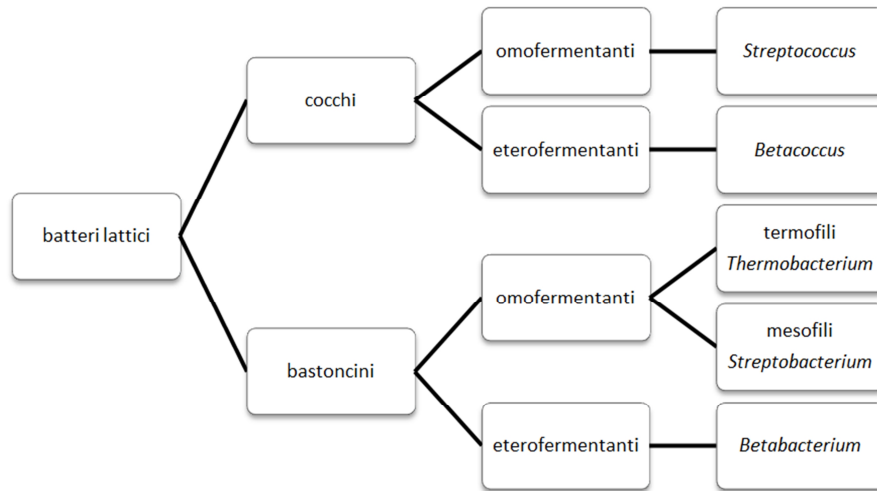


Figura 1. Schema della classificazione di Orla-Jensen (1919)

Rispetto alla classificazione di Orla-Jensen il Bergey's Manual of Systematic Bacteriology nella sua edizione del 2009 ha apportato alcune modifiche relative alla classificazione del genere *Streptococcus*, che è stato ulteriormente suddiviso nei generi *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus sensu stricto* (Holzapfel *et al.*, 2009). Alcuni batteri lattici mobili con caratteristiche simili ai lattococchi sono stati classificati in un genere separato, il genere *Vagococcus*. La classificazione dei generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* è rimasta per lo più invariata, ma alcuni batteri lattici a morfologia bacillare, prima compresi nel genere *Lactobacillus*, ora formano il genere *Carnobacterium*. Un distinto cluster filogenetico di batteri lattici eterofermentanti, comprendente specie precedentemente classificate nei generi *Lactobacillus* o *Leuconostoc*, è stato classificato in un genere separato, *Weissella*; per quanto riguarda la specie *Leuconostoc oenos*, cioè il leuconostoc vinario, attualmente è collocata nel genere *Oenococcus* (Kandler e Weiss, 1986).

I batteri lattici coinvolti nelle trasformazioni alimentari comprendono i generi *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* e *Lactobacillus* (Figura 2) (Stiles e Holzapfel, 1997).

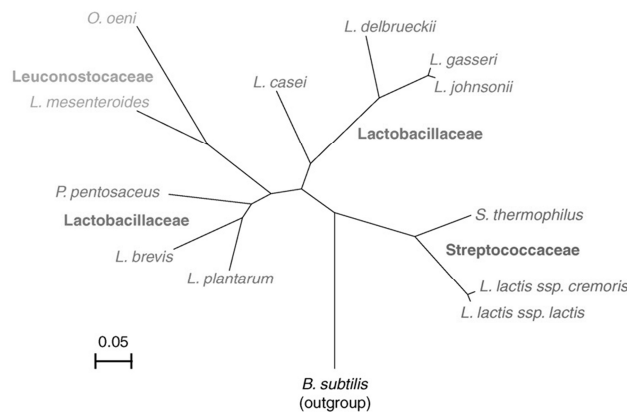


Figura 2. Albero filogenetico dei batteri lattici secondo la tassonomia corrente (Pfeiler e Klaenhammer, 2007)

Le caratteristiche dei batteri lattici sono le seguenti: batteri Gram positivi asporigeni, ubiquitari, di forma coccica o bastoncellare, eterotrofi, non mobili, anaerobi obbligati o facoltativi, acido tolleranti o talvolta acidofili, catalasi negativi. Sono molto esigenti dal punto di vista nutrizionale: richiedono, infatti, substrati complessi per la crescita, quali zuccheri, composti azotati semplici, vitamine, sali minerali e altri fattori di crescita. I LAB sono tipicamente impiegati nella produzione di formaggi, yogurt, insaccati, prodotti vegetali fermentati, prodotti di panetteria-pasticceria e insilati (Bourdichon *et al.*, 2012). Questi microrganismi sono in grado di utilizzare per via fermentativa diversi tipi di glucidi, preferendo monosaccaridi esosi o pentosi e, previa idrolisi, anche disaccaridi quali lattosio, saccarosio, maltosio (Davidson *et al.*, 1996).

In considerazione dell'eterogeneità genotipica e fenotipica, il gruppo dei batteri lattici è caratterizzato dalla presenza di numerosi generi, specie e biotipi. Proprio quest'ultimi possono costituire un'interessante risorsa biotecnologica in quanto possono esprimere caratteri fenotipici di rilievo tecnologico ed ecologico quali ad esempio adattamento e capacità di crescita a differenti temperature, capacità di utilizzare diverse fonti glucidiche, attitudine alla proteolisi, produzione di molecole aromatiche, capacità di tollerare valori di elevata acidità, resistenza a differenti concentrazioni di sale, produzione e/o sensibilità alle batteriocine e capacità di adesione. In relazione a queste caratteristiche, specie e biotipi differenti possono prendere il sopravvento in diverse nicchie ambientali o nella produzione di alimenti conferendo proprietà caratteristiche al prodotto.

1.1 IL GENERE *PEDIOCOCCUS*

Al genere *Pediococcus* appartengono microrganismi di forma sferica descritti come “gli unici batteri lattici acidofili omofermentanti che si dividono alternativamente in due direzioni perpendicolari per formare delle tetradi” (Simpson e Taguchi, 1995); le cellule osservate al microscopio si dispongono preferibilmente in tetradi, anche se si possono osservare cellule in coppia o raramente singole (Figura 3).

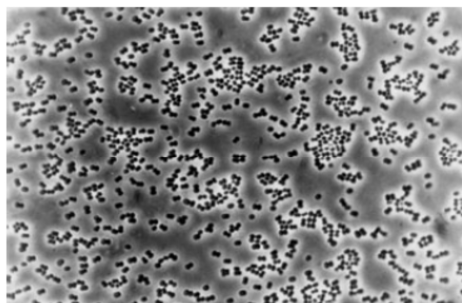


Figura 3. Fotografia in contrasto di fase di *P. damnosus* (Holzapfel *et al.*, 2006)

Sono microrganismi immobili, non sporigeni, anaerobi facoltativi che possono tollerare diverse concentrazioni di ossigeno a seconda della specie. Sono ossidasi negativi, catalasi negativi, anche se alcune specie mostrano di possedere una pseudo-catalasi quando crescono in terreni con un basso contenuto di

carboidrati (Weiss *et al.*, 1992). Tutte le specie possono crescere a 30 °C con un *optimum* compreso tra 25 °C e 35 °C, a valori di pH intorno a 5, e la maggior parte in presenza di concentrazioni di sale del 6,5% (Holzapfel *et al.*, 2006).

Per la classificazione dei pediococchi sono stati usati diversi sistemi basati sulle caratteristiche morfologiche e biochimiche, ma i risultati riportati sono spesso stati contraddittori (Holzapfel *et al.*, 2009). Fu nel 1884 che Balcke utilizzò per la prima volta il nome *Pediococcus cerevisiae*, ma questa specie non fu mai riconosciuta ufficialmente, anzi creò confusione in quanto venne riferita a due specie diverse di pediococchi (Balcke, 1884). Questa prima affermazione però si rivelò il primo passo per attribuire due specie distinte a questi microrganismi.

I batteri lattici che costituiscono il genere *Pediococcus* appartengono alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, infatti dai dati risultanti dalle sequenze del 16S rRNA risultano formare un unico cluster. Attualmente a questo genere appartengono le seguenti specie: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. stilesii* (Franz *et al.*, 2006), *P. ethanolidurans* (Liu *et al.*, 2006), *P. siamensis* (Tanasupawat *et al.*, 2007), *P. claussenii* (Dobson *et al.*, 2002) and *P. cellicola* (Zhang *et al.*, 2006). Utilizzando la tecnica del sequenziamento del 16S rRNA la specie *P. urinaeequi* è stata riclassificata come *Aerococcus urinaeequi* (Felis *et al.*, 2005), mentre la specie *P. halophilus* è stata riclassificata da Collins *et al.* (1990) come la prima specie appartenente al nuovo genere *Tetragenococcus*. La tecnica 16S rRNA si è dimostrata un valido strumento per evidenziare correlazioni all'interno del genere *Pediococcus*, dalla Figura 4 si può infatti osservare la stretta correlazione tra *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* rispetto alle altre specie di pediococchi, mentre *Pediococcus damnosus* mostra un alto grado di affinità a livello genomico con *P. inopinatus* e *P. parvulus* (Dobson *et al.*, 2002).

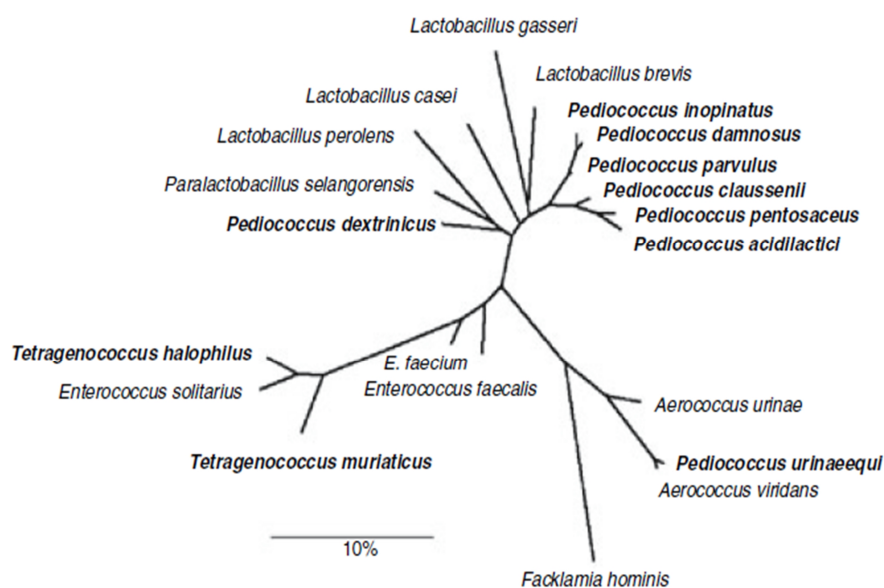


Figura 4. Albero filogenetico del genere *Pediococcus* (Holzapfel *et al.*, 2006)

Per quanto riguarda le specie scoperte recentemente, la specie *P. stilesii* forma un cluster assieme a *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, mentre *P. cellicola* e *P. ethanolidurans* si raggruppano con *P. parvulus*, *P. inopinatus* e *P. damnosus* (Figura 5). La specie *P. dextrinicus* è apparsa distante dalle restanti specie di pediococchi, è stata infatti recentemente riclassificata nel genere *Lactobacillus* sulla base dei risultati ottenuti dalle prove fenotipiche e dalla tecnica *Multi-Locus Sequence Typing*(MLST) (Haakansen *et al.*, 2009).

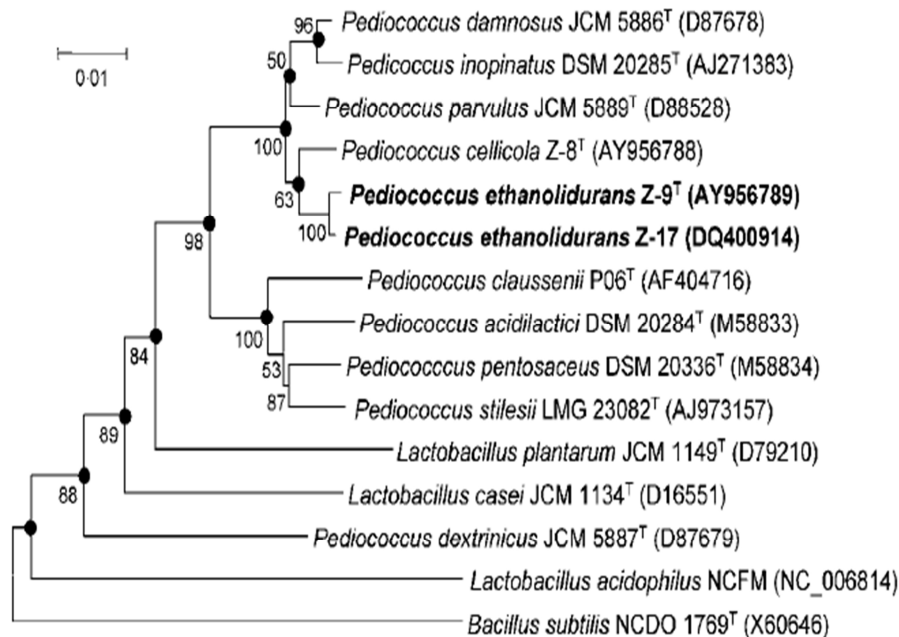


Figura 5. Posizione filogenetica della specie *P. ethanolidurans* (Liu *et al.*, 2006)

Generalmente i pediococchi, come la maggior parte dei LAB, richiedono fattori di crescita complessi e terreni ricchi; l'esigenza di aminoacidi è dipendente dalla specie e può variare anche da ceppo a ceppo. La maggior parte di questi microrganismi necessita di alanina, acido aspartico, acido glutammico, arginina, istidina, isoleucina, fenilalanina, prolina, treonina, tirosina, valina, triptofano, cisteina, glicina e leucina. Sebbene un gran numero di ceppi produca aminopeptidasi, la gran parte cresce in terreni con fonti complesse di azoto (Tzanetaki e Litopolou-Tzanetaki, 1989). Alcuni ceppi di *P. pentosaceus* producono proteasi, dipeptidasi e aminopeptidasi, ma non carbossipeptidasi o endopeptidasi (Bhowmik e Marth, 1990b), mentre *P. parvulus* non possiede attività proteolitica (Davis *et al.*, 1988).

1.1.1 Il genere *Pediococcus* negli alimenti

I pediococchi sono batteri lattici omofermentanti, caratteristica che li rende adatti a condurre processi fermentativi sia di prodotti di origine animale che vegetale. *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* sono utilizzati come colture starter nella produzione di insaccati e nella fermentazione degli insilati (Hammes *et al.*, 1990), mentre nella maturazione dei formaggi essi microbico fanno parte dei cosiddetti "batteri lattici non starter" (NSLAB, Non Starter Lactic Acid Bacteria) (Olson, 1990). In alcuni contesti i pediococchi

possono rappresentare anche una presenza indesiderata, ad esempio nel caso di *P. damnosus*, il cui sviluppo è temuto nel settore birrario poiché in seguito alla formazione di diacetile (sapore di burro) causa alterazione della birra (Sakamoto e Konings, 2003). In Tabella 1 sono riportate alcune fonti di isolamento delle principali specie appartenenti al genere *Pediococcus*.

Tabella 1. Fonti di isolamento delle principali specie appartenenti al genere *Pediococcus* (Holzapfel *et al.*, 2006)

specie	fonte di isolamento
<i>P. acidilactici</i>	ampia varietà di piante e frutti, vegetali fermentati, insilati, cetrioli fermentati e fagioli verdi; insaccati semi-dry, salame Alheira (Albano <i>et al.</i> , 2007), grano, malto e mosto, koko e koko sour, alimento per lo svezzamento a base di sorgo fermentato, differenti prodotti di pesce fermentato, Thai fermentato, condimento chili, farina di mais (Edema e Sanni, 2008), tratto gastrointestinale di pollo, anatra e bovini (Rodriguez-Palacios <i>et al.</i> , 2009), feci di bambini (Mathys <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. pentosaceus</i>	ampia varietà di piante e frutti, vegetali fermentati, insilati, olive, capperi (Perez-Pulido <i>et al.</i> , 2005), crauti, cetrioli fermentati (Singh e Ramesh, 2008) e fagioli verdi, grano, malto e mosto, vino (Strasser de Saad e Manca de Nadra, 1987), togwa (sorgo fermentato), salsicce e salami (Benito <i>et al.</i> , 2007), formaggi, insaccato nem chua (Khan <i>et al.</i> , 2010), pesce affumicato (Thapa e Tamang, 2006), vegetali sott'aceto (Jonganurakkun <i>et al.</i> , 2008), Khadi (dolce indiano) (Sukumar e Ghosh, 2010), germogli di bamboo fermentati (Tamang <i>et al.</i> , 2008), tratto gastrointestinale di pollo e anatra
<i>P. inopinatus</i>	vegetali fermentati, fagioli fermentati, crauti e birra, sidro contaminato e vino
<i>P. parvulus</i>	vegetali fermentati, brovada (Maifreni <i>et al.</i> , 2004), insilati, latte, formaggi, erba, vino, feci di tacchino
<i>P. damnosus</i>	birra, mosto, birra verde, lievito di birra

1.1.1.1 Presenza di pediococchi nei prodotti di origine vegetale

I batteri lattici sono i principali responsabili delle fermentazioni nei vegetali; la microflora indigena varia in funzione del substrato, della temperatura e delle condizioni di raccolta, determinando nel prodotto finale una certa variabilità delle caratteristiche sensoriali (Font de Valdez, 1990). L'utilizzo di colture starter è efficace nella standardizzazione dei processi fermentativi e nel controllo della microflora, soprattutto di quella aerobia (Potts e Fleming, 1982). La fermentazione dei prodotti vegetali (es. crauti) generalmente avviene in due fasi e coinvolge batteri lattici eterofermentanti, in particolare *Leuconostoc* spp., e omofermentanti, quali *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. (Gardner *et al.*, 2001). La variabilità nella durata delle fasi del processo fermentativo e la differente composizione e concentrazione di composti aromatici che si formano dal metabolismo microbico indicano come vi sia un'elevata influenza della microflora presente naturalmente sulla superficie del vegetale e della composizione in zuccheri presenti (Maifreni *et al.*, 2004).

I pediococchi partecipano alle fermentazioni di differenti vegetali, anche se la presenza di questi microrganismi negli ambienti naturali è limitata. Tra le diverse specie di pediococchi *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* sono quelli più frequentemente coinvolti nelle fermentazioni; in essi possono avere un ruolo sia come microflora naturale autoctona sia come starter intenzionalmente inoculati nei processi controllati (Knorr, 1998). Insilati, cetrioli, soia, olive, rape sono alcuni dei prodotti in cui nel processo fermentativo intervengono specie di pediococchi (Maifreni *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni la presenza di pediococchi è stata evidenziata in un numero crescente di alimenti vegetali fermentati, molti dei quali provenienti dal continente africano e asiatico. Diversi autori hanno isolato e identificato la presenza di queste specie microbiche in parecchi prodotti tradizionali fermentati come ad esempio cibi a base di cereali quali il “Togwa”, un alimento tradizionale della Tanzania derivato dalla fermentazione spontanea di sorgo, mais e miglio, e il “Khamir”, pane fermentato della regione dello Gizan in Arabia Saudita (Gassem, 1999; Kunene *et al.*, 2000; Mugula *et al.*, 2003). In Asia sono molto diffusi impasti acidi per l'inoculo di substrati a base di amido utilizzati nella produzione di bevande alcoliche, ottenuti dalla fermentazione spontanea condotta da microrganismi non selezionati presenti nella farina, che rappresentano l'inoculo microbico naturale utilizzato per la produzione di prodotti tipici quali ad esempio “marcha”, “bakhar” o “phab” (Tamang, 1998).

Un aspetto altrettanto rilevante riguarda il ruolo di *Pediococcus* spp. nella fermentazione vinaria. I batteri lattici rivestono un ruolo fondamentale nella produzione del vino: essi sono responsabili della fermentazione malolattica che rappresenta un importante fenomeno secondario che avviene nella maggior parte dei vini al termine della fermentazione alcolica. Questo processo ha un'importante influenza sull'acidità, sull'aroma e sulla stabilità microbiologica del vino (Fleet, 2003). La fermentazione malolattica è associata a *Oenococcus oeni*, ma possono essere coinvolte anche altre specie di LAB tra cui i pediococchi; essi possono anche determinare alterazioni del vino dovute alla loro capacità di produrre esopolisaccaridi, acido acetico e ammine biogene (Manca de Nadra e Strasser de Saad, 1995; Osborne *et al.*, 2000). In alcuni casi diverse specie di *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* possono provocare alterazione del vino durante la conservazione in cantina e dopo l'imbottigliamento (Sponhol, 1993).

La birra è riconosciuta da centinaia di anni come una bevanda che presenta una notevole stabilità dal punto di vista microbiologico. Risulta essere un mezzo sfavorevole alla crescita dei microrganismi grazie alla presenza di etanolo e di composti amari del luppolo (soprattutto iso- α -acidi) tossici particolarmente per i batteri Gram-positivi. Tuttavia, nonostante queste caratteristiche sfavorevoli, alcuni microrganismi riescono a crescere e ad alterare la birra, causando difetti come l'aumento della torbidità, che determina uno scadimento della qualità del prodotto finale (Sakamoto e Konings, 2003). Tra i batteri Gram-positivi alteranti la birra ci sono i batteri lattici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Essi sono riconosciuti come i batteri più pericolosi per la produzione della birra: questi microrganismi, infatti, sono responsabili per il 70% dei casi di alterazioni nel prodotto (Hollerová e Kubizniaková, 2001). La contaminazione da pediococchi nella birra, di cui il *P. damnosus* risulta essere il principale responsabile, porta alla formazione di diacetile che conferisce un sapore di burro al prodotto (Sakamoto e Konings, 2003). Recentemente è stata riconosciuta un'altra specie in grado di resistere ad alte concentrazioni dei composti acidi del luppolo nella birra, si tratta di *P. clausenii* isolato sia come contaminante della birra sia nell'ambiente di produzione (Dobson *et al.*, 2002).

1.1.1.2 Presenza dei *Pediococchi* nei prodotti di origine animale

Nel settore lattiero caseario i batteri lattici vengono impiegati essenzialmente nella produzione di formaggi e diversi tipi di latte fermentato. Da sempre essi costituiscono il mezzo più naturale di difesa e prevenzione nei confronti della microflora indesiderata presente nel latte, contribuendo nel frattempo a migliorarne l'attitudine alla coagulazione.

I *Pediococchi* fanno parte dei NSLAB, che si sviluppano in un'ampia varietà di formaggi nel corso della stagionatura (Coppola *et al.*, 1997), di conseguenza potrebbero essere utilizzati come batteri selezionati nella fermentazione del latte se possedessero la capacità di metabolizzare il lattosio. Per esempio, *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* sono specie termofile in grado di fermentare il lattosio e potrebbero essere utilizzati nelle caseificazioni in alternativa alla specie *S. thermophilus*, che molto spesso è soggetta ad attacchi fagici (Caldwell *et al.*, 1996). Alcuni ceppi vengono invece utilizzati come colture starter per migliorare le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche di formaggi quali formaggio Cheddar e mozzarella (Bhowmik *et al.*, 1990).

Negli insaccati la flora predominante è costituita dai lattobacilli, il cui ruolo principale consiste nell'acidificare rapidamente il substrato in modo da impedire lo sviluppo di microrganismi alteranti. Essi concorrono inoltre alla formazione dell'aroma grazie alla produzione di piccole quantità di ammoniaca e amminoacidi ottenute attraverso processi di deaminazione e decarbossilazione a carico di amminoacidi (Leroy *et al.*, 2006). La carne e i prodotti a base di carne risultano essere un substrato favorevole alla crescita di *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*; in particolare alcuni ceppi giocano ruoli importanti nella fermentazione di insaccati a fermentazione spinta (*summer sausage*) o di altri prodotti affumicati (Gevers *et al.*, 2000). I *Pediococchi* sono stati trovati frequentemente anche in carni e prodotti derivati confezionati sottovuoto o in atmosfera controllata, nei quali la popolazione microbica è molto spesso dominata da specie lattiche (Jones, 2004).

1.1.2 Identificazione del genere *Pediococcus*

Il monitoraggio della popolazione microbica presente negli alimenti fermentati è di fondamentale importanza per la loro qualità, di conseguenza la capacità di isolare ed identificare i batteri coinvolti nelle fermentazioni rappresentano un aspetto rilevante per il controllo del processo.

1.1.2.1 Caratterizzazione fenotipica

Le metodiche diagnostiche tradizionali, generalmente utilizzate per valutare l'evoluzione delle popolazioni dei batteri lattici, si basano su tecniche di conta batterica su piastra, descrizione ed identificazione morfologica, e test fisiologici tradizionali. L'isolamento di *Pediococcus* spp. viene effettuato mediante semina diretta in terreni elettivi di coltura come MRS Agar, Glucose-Yeast Extract Agar oppure terreni selettivi o semi selettivi, come SL medium, Agar Acetato, o per isolamento da birra MRS Agar pH 5,5 (Holzapfel *et al.*, 2006). L'identificazione del genere di appartenenza può avvenire mediante osserva-

zione al microscopico ottico, preferibilmente in contrasto di fase, grazie al quale è possibile visualizzare le cellule sferiche, di dimensione identica, organizzate in tetradi che i pediococchi formano durante la moltiplicazione.

Le caratteristiche generalmente usate per l'identificazione delle specie appartenenti a questo genere includono la crescita a differenti temperature (35°C, 40°C, 45°C e 50°C), pH (4,5, 7 e 8) e concentrazioni di NaCl. Altre metodiche diagnostiche utilizzate per l'identificazione di *Pediococcus* sono i test fisiologici e fenotipici basati su sistemi cromogeno-chimici come l'API® di bioMérieux (Lyon, Francia). Questi test sono stati largamente usati per l'identificazione e la caratterizzazione di *Pediococcus* spp. e per rilevare eventuali differenze tra le specie (Barros *et al.*, 2001). Sono metodiche in grado di differenziare i microrganismi in base alle capacità metaboliche specie-specifiche: in relazione alla tipologia di metabolismo e all'eventuale capacità di fermentare gli zuccheri (Tabella 2) è possibile identificare il batterio. Le reazioni di fermentazione di ogni fonte di carbonio sono determinate in base all'eventuale produzione di acido e al viraggio del colore di una sostanza usata come indicatore (es. Bromcresol purple) (Litopolulou-Tzanetaki *et al.*, 1989).

Tuttavia, anche ceppi con un'elevata similarità DNA-DNA possono rivelare un'ampia variabilità all'interno delle loro caratteristiche fenotipiche e quindi una singola caratteristica non può essere considerata assolutamente discriminante. Di conseguenza, la più completa informazione fenotipica fornita in Tabella 2 può essere fondamentale per prendere una decisione sulle basi fenotipiche. Tuttavia questa tipologia di test, e in particolare i test API, non permette in alcuni casi la corretta identificazione del batterio. Si tratta, infatti, di metodi fortemente dipendenti dallo stato fisiologico dei batteri e, nel caso delle colture su mezzi sintetici, necessitano di lunghe tempistiche di lavoro e forniscono risultati molto variabili. Inoltre i test API, basati sulla fermentazione degli zuccheri, non hanno una specificità tale da saper discriminare esattamente le varie specie (Santos *et al.*, 2005).

Tabella 2. Caratteristiche fenotipiche di *Pediococcus* spp (d, debole; n.d., non determinato) (Holzapfel *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2006)

caratteristica	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. claussenii</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. inopinatus</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>P. cellicola</i>	<i>P. stilesii</i>	<i>P. ethanolidurans</i>
acido da									
amigdalina	+	+	+	d	+	d	-	+	+
arabinosio	d	-/+	-	-	-	-	d	-	-
cellobiosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
destrine	-	-	-	-	d	d	-	-	n.d.
fruttosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galattosio	+	+	-	+	+	d	+	+	+
glucosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
glicerolo	d	d	-	-	-	-	-	-	-
inulina	-	d	-	-	-	-	-	-	-
lattosio	d	+	-	-	+	-	+	-	+/-
maltosio	-	+	d	d	+	d	+	+	+
mannitolo	-	-	d	-	-	-	-	-	-
mannosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+
melezitosio	-	-	-	d	-	-	-	-	-
melibiosio	-	d	-	-	-	-	-	-	-
α -metil-glucoside	-	-	-	d	d	-	d	+	+
raffiniosio	d	d	-	-	-	-	-	-	+
ramnosio	d	d	-	-	-	-	+	-	-
ribosio	+	+	+	-	-	-	+	+	-
salicina	d	d	+	d	+	+	+	+	+
saccarosio	-	d	-	d	d	-	+	-	+
trealosio	d	+	+	d	+	+	+	-	+
xilosio	+	d	-	-	-	-	+	-	+
idrolisi esculina	+	+	n.d.	d	+	+	+	+	-
acido lattico	DL	DL	+	DL	DL	DL	DL	DL	DL
produzione destrani	-	d	L(+)	d	-	-	n.d.	n.d.	n.d.
formazione istamina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
crescita a									
pH 4,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 7,0	+	+	+	-	d	d	+	+	+
pH 8,0	+	+	+	-	-	-	+	+	+
35 °C	+	+	+	-	+	+	+	+	+
40 °C	+	d	+	-	d	-	+	+	+

1.1.2.2 Tecniche molecolari

Negli ultimi anni hanno sono state sviluppate una serie di metodiche diagnostiche di tipo molecolare basate sull'analisi del *fingerprinting* dei batteri lattici, che consentono di far fronte ai limiti delle tecniche tradizionali. La più comune è la PCR-RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) che è risultata applicabile al fine di differenziare tra loro le specie *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* (Nigatu *et al.*, 1998). Questo metodo è molto interessante poiché di semplice applicazione, ma per l'ottenimento di una buona riproducibilità e ripetibilità è necessaria un'alta standardizzazione delle condizioni. Un'altra tecnica di *fingerprinting* basata sulla PCR, simile alla RAPD, è la rep-PCR, che amplifica alcune sequenze conservate ripetute del DNA all'interno del genoma batterico. La riproducibilità è maggiore rispetto alla RAPD e diversi autori l'hanno applicata con successo per classificare i batteri lattici (Khan *et al.*, 2010). La tecnica *Intergenic Spacer Sequence Polymorphism* permette l'amplificazione della regione spaziatrice 16S-23S rRNA, e lo studio del polimorfismo di lunghezza e di sequenza di questa regione ha avuto successo nell'identificazione del gruppo dei batteri lattici a livello di specie (Dolci *et al.*, 2008).

La somiglianza genetica tra le varie specie del genere *Pediococcus* è stata studiata anche attraverso analisi di ibridazione DNA-DNA e analisi delle sequenze del 16S rRNA. La ricerca e l'identificazione di ceppi del genere *Pediococcus* è difficile non solo per la loro somiglianza fenotipica, ma anche per quella genotipica. Le relazioni filogenetiche tra i pediococchi sono basate sulla variabilità dei geni ribosomiali; tuttavia, per la classificazione a livello di specie e sottospecie i geni rRNA risultano altamente conservati tra le varie specie e non risultano discriminanti. Per mettere in evidenza differenze inter- e intraspecifiche è risultata utile l'applicazione della tecnica *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) all'analisi del gene *mle*, codificante per l'enzima malolattico, e di altri 4 geni *housekeeping*: è stato così possibile discriminare alcuni ceppi appartenenti al genere *P. parvulus* e *P. damnosus* con un grado di risoluzione migliore rispetto a quella ottenuta dall'analisi del gene 16S rRNA, dove le sequenze risultavano avere una bassa variabilità (Calmin *et al.*, 2008). Questa tecnica ha anche consentito di stimare la variabilità molecolare di ceppi di *P. acidilactici*, produttori e non produttori di pediocine, provenienti da collezioni internazionali e da alimenti (Mora *et al.*, 2000).

Altre strategie di tipizzazione includono il ribotyping, il BRENDA (*Bacterial Restriction Endonuclease Analysis*), l'analisi dei profili proteici cellulari (WCPP) ottenuti da SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Barros *et al.*, 2001), lo studio di alcuni geni codificanti specifiche proteine (Claisse *et al.*, 2007) e la PCR-specifica (Pfannebecker e Fröhlich, 2008).

Un'altra metodica molecolare per lo studio della diversità del genoma microbico è la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Si basa sull'estrazione del genoma batterico intero, che viene tagliato con enzimi di macrorestrizione determinando la produzione di frammenti di DNA di peso molecolare elevato. Questa tecnica è considerata la "gold standard" per classificare i batteri sulla base del profilo genotipico, grazie all'alta capacità discriminatoria che possiede. In letteratura sono stati descritti diversi studi che

hanno dimostrato che la PFGE è stata in grado sia di discriminare ceppi appartenenti al genere *Pediococcus* a livello specie, sia per determinare il grado di biodiversità all'interno della stessa specie (Simpson *et al.*, 2002).

1.1.3 Applicazioni biotecnologiche

I pediococchi rivestono un'importanza biotecnologica notevole sia per il loro utilizzo come colture starter sia per la loro capacità di produrre batteriocine, il che consente loro di ricoprire un ruolo importante come microrganismi biopreservanti negli alimenti fermentati.

Un impiego dei pediococchi come colture selezionate viene sfruttato nell'industria degli insaccati. Durante la stagionatura si verificano importanti cambiamenti nella struttura, nei caratteri chimico-fisici e organolettici e nella composizione della flora microbica. *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* sono le specie selezionate come starter commerciali per gli insaccati (salsicce semi-dry, salami a breve stagionatura). La scelta dell'impiego di colture starter varia in funzione delle caratteristiche finali del prodotto; i fattori che condizionano il processo sono la temperatura alla quale viene condotto il processo fermentativo e il pH finale del prodotto; ad esempio viene preferito l'utilizzo di *P. acidilactici* se la tecnologia produttiva prevede temperature piuttosto alte di fermentazione e il raggiungimento di valori bassi di pH, mentre ceppi di *P. pentosaceus* possono essere impiegati in processi che richiedono temperature di fermentazione sia alte che basse (Nieto-Lozano *et al.*, 2010).

Nel settore lattiero caseario i pediococchi non rivestono un ruolo nei processi di acidificazione, quanto piuttosto nelle fasi secondarie della stagionatura dei formaggi. In questo settore questi microrganismi si ritrovano nell'ambiente di mungitura, risultano contaminanti del latte e della cagliata, rappresentano una piccola porzione della flora batterica presente nel formaggio e si sviluppano durante la sua maturazione (Ogier *et al.*, 2002). I pediococchi sono stati isolati come NSLAB da vari formaggi tra cui Comtè (Bouton *et al.*, 1998), Salers (Callon *et al.*, 2004), Parmigiano Reggiano (Coppola *et al.*, 1997) e Montasio (Carraro *et al.*, 2011), dove possono prendere parte ai processi di stagionatura attraverso le loro attività proteolitica, lipolitica ed esterolitica (Bouton *et al.*, 1998).

I pediococchi sono noti anche per il ruolo che hanno nella fermentazione dei vegetali; i microrganismi che partecipano al processo fermentativo nella produzione di crauti e "brovada", un prodotto tipico del Friuli Venezia Giulia ottenuto dalla fermentazione delle rape a contatto con le vinacce, consistono principalmente in *Leuconostoc* spp. (Stamer, 1983), *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. In questo prodotto i pediococchi hanno un ruolo fondamentale nella trasformazione del vegetale poiché completano il processo fermentativo (dopo circa 28-32 giorni), portando il pH della rapa a valori di circa 3,5-3,6; la specie *P. parvulus* è risultata essere la specie predominante (Maifreni *et al.*, 2004). Questi microrganismi sono stati associati anche alla fermentazione dei cetrioli e delle olive (Cintas *et al.*, 1995), dove compaiono nella seconda fase del processo fermentativo e possono raggiungere il 35% delle specie lattiche isolate.

Infine, i pediococchi, sono parte della flora naturale di alimenti fermentati africani e asiatici dove mantengono un ruolo rilevante nell'acidificazione delle farine di cereali (Tamang *et al.*, 2008).

La conservazione del foraggio come insilato avviene attraverso una fermentazione naturale nella quale i batteri lattici, tra cui anche alcune specie appartenenti al genere *Pediococcus*, convertono gli zuccheri in acido lattico in condizioni di anaerobiosi, portando a una diminuzione del pH e permettendo di conseguenza la conservazione del foraggio (Arriola *et al.*, 2011). Recentemente l'attenzione si è incentrata sull'uso di batteri omofermentanti da inoculare negli insilati; tuttavia non tutte le colture selezionate si adattano alle condizioni di fermentazione e al tipo di foraggio (Zhang *et al.*, 2000). I pediococchi, in particolare *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, compaiono naturalmente in vari tipi di vegetali utilizzati nell'alimentazione animale (Cai *et al.*, 1999) e sono in grado di migliorare la qualità dei fermentati di *Lolium perenne*. Va sottolineato che la specie *P. acidilactici*, se paragonata ad altri LAB omofermentanti, è in grado di tollerare le alte temperature che si sviluppano durante i processi fermentativi degli insilati (Zhang *et al.*, 2000).

1.1.4 Proprietà correlate alla sicurezza d'uso e all'utilizzo come probiotici

I batteri lattici sono microrganismi ubiquitari, sono presenti negli alimenti e sono costituenti importanti della microflora commensale dell'uomo. L'esposizione umana a questi microrganismi e il loro continuo consumo attraverso gli alimenti ha portato alla conclusione che i batteri lattici siano microrganismi sicuri, anche se negli ultimi anni sono stati segnalati casi di endocarditi in pazienti immunodepressi (Adams, 1999). Recentemente l'European Food Safety Authority (EFSA) ha introdotto il concetto di Qualified Presumption of Safety (QPS), che si applica ai microrganismi introdotti intenzionalmente negli alimenti (Leuschner *et al.*, 2010). Secondo questo concetto la possibilità che una qualunque specie o ceppo possa essere impiegato in alimentazione umana è subordinata alla sua sicurezza d'uso: in particolare i microrganismi presenti nella lista QPS sono quelli che possono essere utilizzati negli alimenti o per la produzione di alimenti, in quanto accompagnate da una ben stabilita storia e status di sicurezza, senza che l'autorità richieda un'opportuna documentazione o ne preveda una particolare valutazione autorizzativa per concederne l'utilizzo. Per i microrganismi che non sono nella lista QPS l'autorizzazione all'utilizzo è subordinata all'accertamento dell'assenza di caratteri correlati a una potenziale patogenicità.

Per quanto riguarda la maggior parte delle specie lattiche utilizzate negli alimenti, queste sono presenti nella lista QPS, e l'unico fattore di rischio è legato alla possibilità di trasferimento di geni legati alla resistenza agli antibiotici (Zonenschain *et al.*, 2009). Tra i pediococchi, solo le specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* hanno la qualifica QPS, mentre per le altre specie presenti negli alimenti (es. *P. parvulus*) le evidenze scientifiche non sono sufficienti ad assicurare lo status QPS.

Tra i caratteri che potrebbero essere presi in considerazione ai fini della valutazione della sicurezza vanno inclusi la resistenza agli antibiotici e la produzione di ammine biogene. Considerando un possibile

uso ai fini probiotici, anche la produzione di batteriocine e la formazione di *biofilm* possono rivestire una certa importanza (Oh *et al.*, 2000; Leeber *et al.*, 2007), in quanto possono influire sulla capacità di colonizzare, almeno transitoriamente, l'ambiente intestinale.

1.1.4.1 Resistenza agli antibiotici

L'introduzione degli antibiotici nella cura delle malattie di origine batterica risale a circa 50 anni fa. Da allora, il rischio più importante connesso all'utilizzo di agenti antimicrobici è stato la comparsa di fenomeni di resistenza da parte di batteri patogeni. Questo problema si è notevolmente amplificato a causa del continuo aumento nell'utilizzo di antibiotici in terapia umana e nel momento in cui è stata evidenziata la capacità dei batteri di trasferire determinanti genici legati alla resistenza ai farmaci a ceppi della stessa specie o a ceppi con elevata similarità genetica (Hughes e Datta, 1983).

L'evoluzione della resistenza agli antibiotici da parte dei batteri agenti di tossinfezioni alimentari è stata ampiamente documentata in questi ultimi anni (Threlfall *et al.*, 2000). La catena alimentare può essere considerata come la principale via di trasmissione dei geni della resistenza agli antibiotici tra l'animale e l'uomo (Witte, 1997). In particolare, i prodotti fermentati che non vengono trattati termicamente prima del consumo possono rappresentare un punto di scambio di geni di resistenza tra i batteri di origine animale e quelli provenienti dal tratto gastrointestinale umano (Cocconcelli *et al.*, 2003).

Molti dati indicano che diverse specie lattiche sono resistenti agli antibiotici. *Enterococcus faecalis* ed *E. faecium* isolati da prodotti carnei e lattiero-caseari presentano spesso fenotipi di multiresistenza (Franz *et al.* 2001). Ceppi di *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri* e *Lb. plantarum* possono veicolare i geni per la resistenza alla tetraciclina e all'eritromicina (Cataloluk e Gogebaken, 2004; Mathur e Singh, 2005), mentre per quanto riguarda il genere *Pediococcus* i dati disponibili sono piuttosto scarsi.

Tra i farmaci antimicrobici penicillina G, imipenem, gentamicina, netilmicina, eritromicina, rifampicina, cloramfenicolo e daptomicina sono attivi nei confronti di *Pediococcus* spp. (Temmerman *et al.*, 2003), anche se i livelli di sensibilità dipendono dalla specie. Al contrario questi microrganismi sono risultati essere resistenti a glicopeptidi come vancomicina e teicoplanina, a streptomina, kanamicina, doxiciclina, ciprofloxacina, sulfametossazolo e trimetoprim-sulfametossazolo; in particolare *P. acidilactici* si è dimostrato particolarmente resistente nei confronti della tetraciclina (Danielsen *et al.*, 2006).

1.1.4.2 Attività aminoacido-decarbossilica

Le ammine biogene sono composti azotati a basso peso molecolare che si formano principalmente per decarbossilazione microbica degli amminoacidi, oppure attraverso l'amminazione o transamminazione di aldeidi e chetoni (Brink *et al.*, 1990). Sebbene alcune ammine biogene siano indispensabili allo svolgimento di importanti funzioni cellulari animali, il consumo di alimenti che ne contengano quantità elevate può dare luogo a gravi effetti tossicologici quali crisi ipertensiva, ipotensione, nausea, vomito,

edemi, palpitazioni, ecc. (Halász *et al.*, 1994). I precursori delle ammine biogene più importanti dal punto di vista alimentare sono l'istidina (da cui si origina l'istamina), la tirosina (tiramina), la lisina (cadaverina), l'ornitina (putrescina), l'arginina (spermina e spermidina), il triptofano (triptamina) e l'idrossitriptofano (serotonina).

Queste sostanze sono presenti normalmente in alimenti che hanno subito dei fenomeni di tipo degradativo (es. pesce), ma possono essere presenti anche in alimenti in buono stato di conservazione; i prodotti maggiormente coinvolti nella formazione di ammine biogene sono quelli in cui la matrice è prevalentemente di tipo proteico e in cui la trasformazione preveda un processo fermentativo: in questi prodotti l'elevata presenza di microrganismi conduce spesso inevitabilmente all'accumulo considerevole di ammine biogene, in particolare di tiramina, 2-feniletilammina, triptamina, cadaverina, putrescina ed istamina (Edward e Sandine, 1981). Alcuni autori hanno ipotizzato che la produzione di ammine sia associata ad un meccanismo di protezione dei microrganismi contro l'acidità dell'ambiente di crescita: al fine di neutralizzare tale acidità e quindi garantire la propria vitalità, i microrganismi produrrebbero le ammine, che sono composti basici (Bunčić *et al.*, 1993).

Molte specie microbiche sono state identificate come potenziali produttrici di ammine biogene. Per quanto riguarda i LAB, molti autori hanno evidenziato un'attività decarbossilasica più o meno intensa nei confronti di istidina, tirosina, lisina, e ornitina prodotti da ceppi isolati da diversi alimenti e bevande (Joo-stein e Northolth, 1987; Lonvaud-Funel, 2001; Bover-Cid *et al.*, 2001). In diversi ceppi di *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* è stata evidenziata attività decarbossilasica nei confronti di diversi aminoacidi (Bover-Cid e Holzapfel, 1999; Marino *et al.*, 2008). *Pediococcus spp.*, solitamente viene riconosciuto come produttore di ammine in formaggio (Cronin *et al.*, 2007), birra, dove è in grado di formare tiramina durante la fermentazione (Izquierdo-Pulido *et al.*, 1997). Nei salami e nel vino il genere *Pediococcus* è considerato il principale responsabile nella produzione di istamina (Delfini, 1989; Komprda *et al.*, 2009).

1.1.4.3 Formazione di biofilm

In natura e nei sistemi alimentari i microrganismi vivono per lo più in forma sessile, cioè aderenti a superfici sulle quali trovano nutrienti sufficienti a sostenere la loro sopravvivenza/crescita. Questi microrganismi inizialmente si depositano sulle superfici e quindi vi aderiscono, crescono e si moltiplicano attivamente fino a formare colonie di cellule. In questa fase è fondamentale la sintesi di polimeri di natura organica, i quali contribuiscono a una adeguata colonizzazione del microrganismo. Questa massa di cellule diventa quindi così grande da intrappolare residui di natura organica ed inorganica, nutrienti e altri microrganismi portando così alla formazione di un *biofilm* (Kumar e Anand, 1998). Il termine *biofilm* definisce quindi una matrice di cellule biologicamente attive e sostanze extracellulari in associazione con una superficie solida. Una volta che il *biofilm* microbico si è formato, l'espressione genica delle cellule si dif-

ferenza di molto da quella delle cellule libere, portando a importanti modificazioni fenotipiche, tra cui una aumentata resistenza alle sostanze antimicrobiche (Costerton, 2005).

Nei sistemi alimentari l'adesione dei microrganismi e la formazione di *biofilm* sono fenomeni per lo più indesiderati, in quanto portano a seri problemi di natura igienica e perdite di natura economica in seguito all'alterazione dei prodotti (Martin *et al.*, 2011). Oltre a questo, anche molti noti patogeni alimentari, quali per esempio *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, sono in grado di aderire alle superfici, comportando così un grave rischio per la salute (Wong, 1991). Gli agenti patogeni e alteranti si possono accumulare come *biofilm* su acciaio inossidabile, alluminio, vetro, guarnizioni di teflon e nylon, materiali tipici degli ambienti di trasformazione alimentare (Mafu *et al.*, 1990).

Per quanto riguarda i batteri lattici, gli studi effettuati su questo argomento sono molto limitati e riguardano quasi esclusivamente il settore lattiero-caseario, in quanto comunemente si ritiene che questi microrganismi siano sicuri. In realtà è stato evidenziato che ceppi di *Lb. bulgaricus* sono in grado di aderire all'acciaio inox (Zoltai *et al.*, 1981), mentre *Lactobacillus curvatus* e *Lb. fermentum* possono formare biofilm e causare difetti nei formaggi (Somers *et al.*, 2001). Anche *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* sono in grado di aderire alle superfici e formare biofilm (Gunduz e Tunnel, 2006). In alcuni casi particolari (es. inoculo in continuo di latte per produzione di yogurt e formaggi) la produzione di biofilm da parte di batteri lattici può essere una caratteristica positiva (Champagne *et al.*, 1994). La capacità di aderire alle superfici e di formare biofilm è una caratteristica interessante anche nel caso dei microrganismi potenziali probiotici, in quanto è un indice della potenzialità di colonizzare con successo l'ambiente intestinale o altre superfici corporee (Comelli *et al.*, 2002).

1.1.4.4 Capacità di produrre batteriocine

Molti batteri sono in grado di produrre peptidi con proprietà antimicrobiche che vengono utilizzate come meccanismo di difesa nei confronti di altri microrganismi. Queste sostanze sono definite batteriocine, e sono sintetizzate nelle fasi di crescita corrispondenti al termine della fase logaritmica o durante la fase stazionaria (Juncioni de Arauz *et al.*, 2009).

I batteri Gram positivi producono batteriocine di piccole dimensioni, che si dimostrano attive già a concentrazioni molto basse; tuttavia lo spettro d'azione nei confronti delle diverse specie microbiche, a questi valori, è piuttosto limitato. Le batteriocine sintetizzate dai batteri lattici possono essere suddivise in tre gruppi: i lantibiotici, che sono batteriocine modificate (classe I), i non-lantibiotici, che hanno la caratteristica di essere termostabili e non modificate (classe II), infine un gruppo di batteriocine altamente instabili (classe III) (Papagianni e Anastasiadou, 2009). Negli ultimi vent'anni la maggior parte di questi peptidi antimicrobici è stata identificata e ampiamente studiata. Per quanto riguarda i lattobacilli, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* e *Lb. plantarum* (Juillard *et al.*, 1987) sono stati riconosciuti produttori di batteriocine. La nisina e la diplococcina sono due batteriocine prodotte da alcune specie di lattococchi. La nisina è stata utilizzata per la prima volta nel 1951 con buoni risultati per prevenire il gonfio-

re nei formaggi provocato dalla fermentazione butirrica dei clostridi (Hirsch et al, 1951). Essa è riconosciuta essere attiva nei confronti Gram-positivi, tra cui *Listeria monocytogenes* e verso le spore di *Clostridium botulinum* (Harris et al., 1989).

Gli ottimi risultati conseguiti con l'utilizzo della nisina hanno stimolato i ricercatori verso lo studio di nuovi ceppi produttori. Questo ha condotto all'individuazione di un numero crescente di batteriocine da utilizzare come potenziali conservanti naturali, tra i quali i più promettenti sembrano essere le pediocine, appartenenti alla classe II prodotte da *Pediococcus* spp. e conosciute come batteriocine "anti-*Listeria*" (Papagianni e Anastasiadou, 2009). In generale le batteriocine di classe II hanno un ampio spettro di azione, tutte sono attive contro *Listeria spp.* e verso altri batteri patogeni Gram positivi, come *Clostridium spp.* e *Enterococcus spp.* La maggior parte dei geni codificanti le batteriocine sono situati su un plasmide (Drider et al., 2006); Graham and Mc Cay (1985) sono stati i primi a studiare il plasmide responsabile della produzione della pediocina prodotta dal ceppo *P. pentosaceus* FBB63, successivamente altri studi (Coderre e Somkuti, 1999) hanno associato la presenza di un plasmide alla sintesi di pediocine.

Numerosi ceppi appartenenti alle specie *Pediococcus* si sono rivelati produttori di queste sostanze come ad esempio *P. acidilactici* (Lonzano et al., 1992), *P. pentosaceus* e *P. damnosus*. In particolare la pediocina AcH, prodotta da *P. acidilactici*, è quella più conosciuta e più studiata. La produzione di questo peptide è influenzata da parametri nutrizionali, pH e dalla disponibilità di ossigeno, ma in generale i fattori ambientali e nutrizionali condizionano la produzione (Biswas et al., 1991).

L'uso di starter contenenti ceppi produttori di batteriocine può migliorare la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari. Ovviamente, è necessario valutare che queste sostanze possano essere prodotte e siano attive nelle matrici alimentari; a questo proposito si è infatti osservato che le batteriocine sono più attive nei mezzi liquidi che in quelli solidi. Inoltre, l'attività delle batteriocine in vivo può essere ridotta da possibili legami con i componenti dell'alimento, dall'azione destabilizzante delle proteasi e altri enzimi e da una irregolare distribuzione nella matrice alimentare (Schillinger et al., 1996).

1.1.4.5 Attività probiotica

Negli ultimi anni si è assistito ad un interesse crescente riguardo alla possibilità di prevenire e/o promuovere la salute attraverso l'utilizzo di batteri probiotici intenzionalmente aggiunti agli alimenti. I probiotici sono definiti "supplementi microbici vitali che, assunti in adeguate quantità, apportano benefici all'ospite" (FAO/WHO, 2002). I benefici apportati dai probiotici alla salute del consumatore possono essere suddivisi in benefici nutrizionali e terapeutici. I primi includono l'aumento nella bio-disponibilità di calcio, zinco, ferro, magnesio, rame e fosforo, l'incremento della digeribilità delle proteine e la produzione di vitamine (Brassart e Schriffirin, 1997). I benefici terapeutici vengono sfruttati per curare disfunzioni come disordini gastrointestinali, iper-colesterolemia, costipazione, infiammazione dell'intestino, intolleranza al lattosio, allergie alimentari (Prasad et al., 1999). Queste disfunzioni sono associate a disturbi nella microflora intestinale e a diversi gradi di infiammazione della mucosa intestinale. Per avere un effetto

nei confronti di queste disfunzioni il microrganismo deve essere capace di sopravvivere all'acidità dei succhi gastrici dello stomaco, deve essere in grado di aderire alle cellule dell'epitelio intestinale ed infine deve colonizzare temporaneamente la mucosa intestinale.

La maggior parte dei microrganismi utilizzati come probiotici appartiene ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*: di fatto questi due generi microbici rappresentano dei membri importanti della normale microflora di tutto il tratto gastrointestinale e contribuiscono al benessere fisiologico dell'individuo (Salminen *et al.*, 1998). I pediococchi sono utilizzati raramente come probiotici. Tuttavia, in questi ultimi anni sono stati effettuati degli studi sull'attività probiotica di ceppi di *Pediococcus* spp.: questi studi hanno dimostrato che i pediococchi sono in grado di sopravvivere all'elevata acidità, alla presenza di bile e di produrre batteriocine (Sukumar e Ghosh, 2010; Yuksekdag e Aslim, 2010). Altri autori hanno osservato una elevata attività antimicrobica e la capacità di sopravvivere a condizioni che simulano quelle del tratto gastrointestinale in *P. parvulus* 2.6, ceppo utilizzato come starter in prodotti fermentati a base di avena (Immerstrand *et al.*, 2010).

MATERIALI E METODI

2 MATERIALI E METODI

Il presente studio è stata condotto su un totale di 111 ceppi appartenenti al genere *Pediococcus*, di cui:

- 60 ceppi isolati nel corso di questa sperimentazione da differenti matrici alimentari (vegetali fermentati, latte/cagliate/formaggi, starter per insaccati, birra)*
- 39 provenienti da collezioni di altri autori;
- 12 provenienti da collezioni internazionali quali Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) and Belgian Coordinated Collections of Microorganism (BCCM/ LMG).

In Tabella 3 è riportato l'elenco completo dei ceppi utilizzati. I ceppi sono stati conservati a -80 °C in brodo MRS (Oxoid, Milano) addizionato al 30% di glicerolo sterile (Sigma, Milano). L'allestimento delle colture utilizzate nella sperimentazione è stato effettuato inoculando un'ansata del ceppo crioconservato in brodo MRS, che è stato incubato a 30 °C per 24 h (*coltura overnight*). La sperimentazione ha previsto le seguenti fasi:



* L'isolamento è stato effettuato previo campionamento degli alimenti su piastre di MRS agar (Oxoid, Italia) a pH 5,5, incubate a 30 °C per 48 h, da cui è stato isolato un numero rappresentativo di colonie che sono state sottoposte alla colorazione di Gram, osservazione al microscopio e test della catalasi. Gli isolati Gram positivi, catalasi negativi e con una disposizione a tetradi sono state sottoposti alle prove successive.

Tabella 3. Ceppi di *Pediococcus* spp. utilizzati nel presente studio

ceppo	fonte di isolamento	origine
BR 1	vegetale fermentato	questo studio
BR 2	“	“
BR 3	“	“
BR 4	“	“
BR 5	“	“
BR 6	“	“
BR 155	“	“
BR 156	“	“
BR 157	“	“
BR 158	“	“
BR 160	“	“
BR 167	“	“
BR 169	“	“
BR 170	“	“
BR 174	“	“
BR 179	“	“
BR 180	“	“
BR 184	“	“
BR 186	“	“
BR 187	“	“
BR 188	“	“
BR 194	“	“
BR 206	“	“
BR 207	“	“
BR 231	“	“
BR 250	“	“
BR 252	“	“
BR 253	“	“
BR 265	“	“
BR 267	“	“
BR 269	“	“
BR 276	“	“
BR 282	“	“
BR 288	“	“
BR 296	“	“
BR 297	“	“
BR 301	“	“
BR 307	“	“
BR 308	“	“
BR 310	“	“
BR 314	“	“
BR 318	“	“
BR 332	“	“
1642 FR	formaggio	“
1637 FR	“	“
1644 FR	“	“
R 91	“	“
SB 66	“	“
SB 97	“	“
Y 66	“	“
MR 64	“	“
2342 FR	“	“
2653 FR	“	“
2702 FR	latte	“
F 1	starter per insaccati	Bactoferm-CHR Hansen
T-SPX	“	“
M 1	farina	Prof. R. Foschino, DISTAM, Università degli Studi di Milano
M 3	impasto acido	”
M 4	“	”
P-CR	“	questo studio
RAF 30707	formaggio	Prof.ssa S. Torriani, Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona

ceppo	fonte di isolamento	origine
RAF 15824	“	”
BFE 409	vegetale fermentato	Dr. J. P. Tamang, Department of Botany, Sikkim Government College, Gangtok, Sikkim, India
BFE 412	“	”
BFE 418	“	”
BFE 945	“	”
BFE 946	“	”
BFE 950	“	”
BFE 965	“	”
BFE 1476	“	”
BFE 1478	“	”
BFE 1480	“	”
BFE 1481	“	”
BFE 1492	latte fermentato	”
BFE 2602	vegetale fermentato	”
BFE 2608	“	”
BFE 2611	“	”
BFE 2618	“	”
BFE 2625	“	”
KLB 33-2P	campione clinico	Dr. L. Tao, Department of Biology Chicago, University of Illinois
KLB 62-2P	“	”
KLB 67-1P	“	”
KLB 71-2P	“	”
UGA 139-4P	“	”
L 200	vegetale fermentato	Dr. D. S. Nielsen, Department of Food Science, Food Microbiology, Center for Advanced Food Studies (LMC), Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark
L 511	“	“
9 AN	latte	Prof.ssa F. Clementi, Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università Politecnica delle Marche
18 AN	cagliata	”
19 AN	formaggio	”
24 AN	“	”
801 PR	cagliata	Prof.ssa M. Gatti, Dipartimento di Genetica, Biologia dei microrganismi, Antropologia, Evoluzione, Università degli Studi di Parma
807 PR	“	”
1319 PR	formaggio	”
1600 PR	“	”
602 B	industria birraria	questo studio
603 B	“	“
604 B	“	“
605 B	“	“
DSMZ 20331		DSMZ
DSMZ 20332		“
DSMZ 20336		“
DSMZ 20238		“
DSMZ 14800		“
DSMZ 18001		“
DSMZ 28285		“
DSMZ 17757		“
LMG 23597		LMG
CECT 923		CECT
CECT 4791		“
CECT 4794		“

2.1 IDENTIFICAZIONE DEL GENERE E DELLA SPECIE

Per l'identificazione degli isolati è stata prima effettuata un'estrazione del DNA dalle colture pure e la quantificazione del DNA estratto. Si è poi proceduto a un'identificazione del genere *Pediococcus* attraverso una PCR specifica, quindi al sequenziamento parziale di una regione di ca. 630 bp del gene 16S rRNA. A ulteriore conferma dell'identificazione, i ceppi sono stati testati attraverso una PCR multiplex specie-specifica per il genere *Pediococcus*.

2.1.1 Estrazione del DNA

I microrganismi sono stati sottoposti a estrazione del DNA utilizzando il kit InstaGene (BioRad, Segrate, Milano), che utilizza una resina chelante, il Chelex 100, la quale assicura la completa rimozione di inibitori della PCR e quindi permette l'ottenimento di DNA direttamente utilizzabile in PCR.

Dalle colture *overnight* si è proceduto alla semina di un'ansata in piastra di MRS agar, incubata a 30 °C per 24-28 h. 2 colonie sono state quindi sottoposte ad estrazione del DNA secondo il protocollo indicato dal produttore.

2.1.2 Quantificazione e valutazione qualitativa del DNA

La valutazione della quantità e della qualità del DNA estratto dalle colture microbiche è stata effettuata utilizzando il NanoDrop-1000 (Thermo Scientific, Milano), uno spettrofotometro UV-visibile capace di lavorare con microvolumi di campione. La valutazione della quantità di DNA è stata effettuata attraverso una valutazione dell'assorbanza a 260 nm, mentre il calcolo del rapporto tra i valori delle assorbanze lette a 260 nm e a 280 nm (A_{260}/A_{280}) ha consentito di valutare il grado di purezza del DNA. Se il DNA è privo di contaminanti, tale rapporto è compreso tra 1,8 e 2,1; sono i campioni che rientravano in tale *range* sono stati sottoposti agli studi successivi.

2.1.3 PCR specifica per l'identificazione del genere *Pediococcus*

La PCR specifica per l'identificazione di *Pediococcus* spp. è stata condotta utilizzando i primers 23S_F (GAACTCGTGTACGTTGAAAAGTGCTGA) e 23S_R (GCGTCCCTCCATTGTTCAAACAAG) secondo il protocollo messo a punto da Pfannebecker *et al.* (2008). Come controlli negativi sono stati utilizzati i ceppi *Lactobacillus brevis* CECT 5354, *Lactobacillus plantarum* DSMZ 10492, *Lactobacillus delbrueckii* CECT 282, *Lactobacillus buchnerii* CECT 4111 e *Lactococcus lactis* DSMZ 20069. I prodotti di amplificazione sono stati separati per elettroforesi a 110 volt per 40' su gel di agarosio (Gelly Phor® LE Euroclone, Milano, Italia) al 2% addizionato di etidio bromuro 0,5 µg/mL (Sigma, Italia) in 0,5 x TBE (Tris-Borate-EDTA buffer, Sigma, Milano). Le immagini dei gel sono state analizzate al transilluminatore UV Syngene (Cambridge, UK) e fotografate utilizzando il programma GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK).

2.1.4 Sequenziamento parziale del gene 16S rRNA

2.1.4.1 Allestimento della reazione di sequenza

La reazione di sequenziamento è stata allestita utilizzando il Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Monza, MB). Per ciascun campione è stata allestita una miscela di reazione, in un volume finale di 10 μ L, contenente 1,5 μ L di Sequencing Buffer 5x (fornito col kit), 0,32 μ L di primer P1V1 10 μ M (5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC-3'), 0,5 μ L di Big Dye Terminator (fornito col kit), 5,18 μ L di H₂O e 2,5 μ L di DNA (100 ng/ μ L). Il ciclo di amplificazione era il seguente: 25 cicli di 96 °C per 10'', 50 °C per 5'' e 60 °C per 4'.

2.1.4.2 Precipitazione del prodotto di PCR e sequenziamento

I prodotti di PCR ottenuti sono stati sottoposti a precipitazione per concentrare il DNA amplificato ed eliminare i reagenti in eccesso derivanti dalla reazione di sequenza. Il protocollo di precipitazione prevedeva l'aggiunta, ad ogni amplificato, di 2 μ L di sodio acetato 3 M (Sigma, Milano) a pH 5,2 e 53 μ L di etanolo al 95% (Sigma, Milano). Dopo un'incubazione a temperatura ambiente per 15', i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 30'. Dopo aver eliminato il surnatante, i campioni sono stati addizionati di 70 μ L di etanolo al 70% e sono stati centrifugati a 2000 rpm per 15'. Una volta eliminato il surnatante, i pellet sono stati asciugati a 60 °C per 30' allo scopo di eliminare completamente l'etanolo presente. Una volta asciutto, il pellet è stato risospeso in 15 μ L di H₂O. I prodotti così ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento automatico sul sequenziatore ABI 3100 (Applied Biosystem, Monza, MB).

2.1.4.3 Analisi bioinformatiche

Per la lettura dei file delle sequenze è stato utilizzato il software ChromasPro ver. 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia) che permette la visualizzazione dei cromatogrammi dei segnali di fluorescenza emessi dalle diverse sonde corrispondenti alle quattro basi del DNA (Figura 6) e l'ottenimento delle sequenze in formato FASTA. Le sequenze ottenute sono state allineate con quelle presenti nel database di sequenze nucleotidiche GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

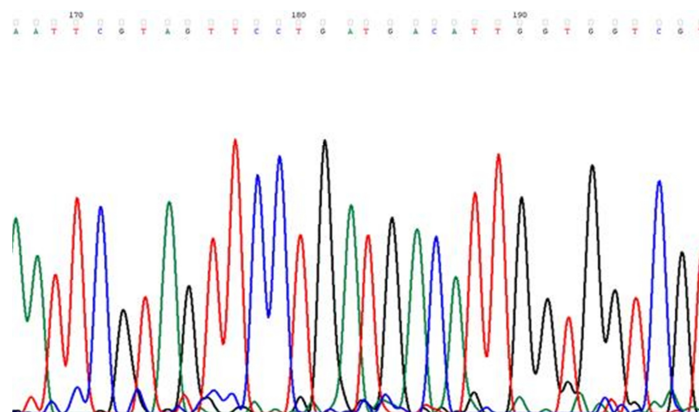


Figura 6. Particolare del cromatogramma del ceppo 1637 FR analizzato con ChromasPro

2.1.5 PCR specie-specifica

La PCR specifica per l'identificazione delle specie *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. cellicola*, *P. stilesii*, *P. inopinatus* e *P. clauseni* è stata condotta utilizzando il protocollo multiplex messo a punto da Pfannebecker *et al.* (2008). I prodotti di amplificazione sono stati separati per elettroforesi a 110 volt per 40' su gel di agarosio (Gelly Phor® LE Euroclone, Milano, Italia) al 2% addizionato di etidio bromuro 0,5 µg/mL (Sigma, Italia) in 0,5 x TBE (Tris-Borate-EDTA buffer, Sigma, Milano). Le immagini dei gel sono state analizzate al transilluminatore UV Syngene (Cambridge, UK) e fotografate utilizzando il programma GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK).

2.2 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ISOLATI

2.2.1 Caratterizzazione biochimica

Dopo l'identificazione i ceppi sono stati testati per la capacità di crescita in diverse condizioni colturali (temperatura, pH e % NaCl) e per la capacità di fermentare 22 zuccheri. Dove non altrimenti specificato le prove sono state condotte in triplo.

2.2.1.1 Prove di crescita a diverse temperature

E' stata saggiata la capacità dei ceppi di crescere a 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40°C, 45 °C e 50 °C. 10 mL di brodo MRS (Oxoid, Italia) sono stati inoculati con 10 µL di coltura *overnight* ed incubati alla rispettiva temperatura per 48 ore. Dopo il periodo di incubazione, l'intorbidimento del brodo di coltura indicava l'avvenuta crescita del microrganismo testato.

2.2.1.2 Prove di crescita a diversi valori di pH

Le prove di crescita sono state condotte in 10 mL di brodo MRS acidificato a pH 3,5, 4,2 e 5 con acido cloridrico 1N (Sigma, Italia) e inoculato con 10 µL di coltura *overnight* del rispettivo ceppo. Dopo incubazione a 30 °C per 48 ore la crescita del ceppo testato era evidenziata da un intorbidimento del brodo di coltura.

2.2.1.3 Prove di crescita a diverse concentrazioni di NaCl

E' stata testata la crescita dei ceppi in brodo MRS contenente il 4%, 6,5%, 8% e 10% di NaCl (Carlo Erba, Italia). 10 mL di terreno sono stati inoculati con 10 µL di coltura *overnight* e incubati a 30 °C per 48 ore. Dopo incubazione, l'intorbidimento del brodo di coltura indicava crescita del ceppo.

2.2.1.4 Prove di fermentazione di differenti zuccheri

E' stato allestito un terreno come segue:

Bacteriological Peptone (Oxoid, Italia)	10 g
Yeast Extract (Oxoid, Italia)	5 g
Potassio fosfato monoacido (Carlo Erba, Italia)	2 g
Sodio acetato (Merck, Italia)	5 g
Tri-ammonio citrato (Sigma, Italia)	2 g
Magnesio solfato eptaidrato (Carlo Erba, Italia)	0,2 g
Manganese solfato tetraidrato (Carlo Erba Italia,)	0,05 g
Rosso clorofenolo (Sigma, Italia)	0,04 g
H ₂ O deionizzata	1000 mL

Il terreno base a un pH compreso tra 6,2 e 6,4 è stato addizionato di una soluzione sterile dello specifico zucchero (Sigma, Milano) tale da portare la concentrazione finale dello zucchero al 2%. Sono stati testati 22 differenti zuccheri: adonitolo, arabinosio, cellobiosio, dulcitol, eritritolo, galattosio, glicerolo, glucosio, fruttosio, lattosio, maltosio, mannitolo, mannosio, melezzitosio, melibiosio, raffiniosio, ramnosio, ribosio, saccarosio, sorbitolo, trealosio e xilosio.

Il test è stato condotto in micropiastre da 96 pozzetti contenenti 500 µL di terreno inoculato con 5 µL di coltura overnight di ogni ceppo. La lettura delle piastre veniva effettuata dopo incubazione a 30 °C per 48 ore, e il viraggio del terreno da rosso a giallo indicava la fermentazione dello specifico zucchero. Questa prova è stata condotta in doppio.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il software Statistica 8.0 (StatSoft Italia srl, Vigonza, Padova) mediante il raggruppamento UPMGA.

2.2.2 Caratterizzazione tecnologica degli isolati

In questa fase della sperimentazione per ogni ceppo sono state valutate le cinetiche di acidificazione e di crescita a differenti temperature, nonché l'attività proteolitica. Le prove sono state effettuate in doppio.

2.2.2.1 Studio delle cinetiche di acidificazione

Per ogni ceppo, 250 mL di MRS broth sono stati inoculati all'1% con una coltura *overnight* diluita fino ad avere una torbidità pari a 0,5 Mc Farland. Le colture sono state incubate a 20 °C e a 30 °C e a intervalli di tempo di 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 48 e 72 ore si è proceduto alla misurazione del pH raggiunto utilizzando una sonda per pH (Crison Strumenti, Carpi, Modena). L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il software Statistica 8.0 (StatSoft Italia srl, Vigonza, Padova) stimando i punti ottenuti con l'equazione elaborata da De Brabandere e De Baerdemaeker (1999):

$$pH = pH_0 + (pH_\infty - pH_0) \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu e}{(pH_\infty - pH_0)} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Per ogni ceppo sono stati stimati i seguenti parametri: pH_0 (pH iniziale), pH_∞ (pH finale), λ (durata della fase *lag*, espressa in h) e μ (massima velocità di decremento del pH, espressa in $\Delta pH/h$).

2.2.2.2 Studio delle cinetiche di crescita a differenti temperature

Per valutare le cinetiche di crescita a differenti temperature, 5 mL di brodo MRS sono stati inoculati all'1% con la coltura *overnight* diluita fino a una concentrazione 0,5 Mc Farland. 200 μL di ogni coltura inocolata sono stati dispensati in micropiastre da 96 pozzetti con fondo a U (Corning, Amsterdam), che sono state incubate per 48 ore a 20 °C e 30 °C in un lettore di micropiastre Sunrise (Tecan, Männedorf, Svizzera). La densità ottica (OD) dei singoli pozzetti è stata letta a 630 nm ogni 60'. L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il software Statistica 8.0 (StatSoft Italia srl, Vigonza, Padova) stimando i punti ottenuti con l'equazione di Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990):

$$y = A \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Per ogni ceppo sono stati stimati i seguenti parametri: A (differenza di OD_{630} tra l'inizio e la fine dell'incubazione), λ (durata della fase *lag*, espressa in h) e μ_m (massima velocità di aumento del valore di OD_{630} , espressa in $\Delta OD/h$).

2.2.2.3 Valutazione dell'attività proteolitica

La valutazione dell'attività proteolitica è stata effettuata in latte. 10 ml di Skim Milk Powder (Oxoid, Italia) sono stati inoculati all'1% con la coltura *overnight* di ogni ceppo e incubati a 30 °C fino all'inizio della formazione del coagulo. Questa coltura è stata quindi utilizzata per inoculare all'1% 10 ml di Skim Milk Powder, che sono stati incubati a 30 °C per 10 giorni. Al termine dell'incubazione le colture sono state analizzate applicando il metodo dell'orto-phtaldialdeide (OPA) (Church *et al.*, 1983): 2,5 mL di latte coagulato è stato aggiunto di 0,5 mL di acqua distillata e 5 mL di acido tricloroacetico 0,72 N (Baker, USA) per precipitare le proteine. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 10' i campioni sono stati filtrati su carta da filtro Watman n. 1; sono stati quindi prelevati 50 μL di campione filtrato, cui è stato aggiunto 1 mL di reattivo OPA. Dopo agitazione del campione e sosta di 2' si è proceduto alla lettura dei campioni allo spettrofotometro a 340 nm. L'assorbanza dei campioni è stata confrontata con quella di soluzioni contenenti concentrazioni note di glicina, e l'allestimento di una retta di taratura ha consentito di esprimere l'attività proteolitica in termini di $\mu L/ml$ di glicina liberata.

2.2.3 Valutazione degli attributi di sicurezza e dell'attività probiotica

Al fine di investigare la diffusione, tra tutti gli isolati, di caratteri potenzialmente correlati alla salute e alla sicurezza, i ceppi sono stati testati per determinarne la capacità di resistere all'acidità e alla bile, la resistenza agli antibiotici, la formazione di biofilm, la produzione di ammine e l'attività batteriocinogenica.

2.2.3.1 Capacità di resistere all'acidità e alla presenza di bile

I ceppi sono stati testati per determinarne la capacità di resistere all'acidità e alla bile secondo il protocollo messo a punto da Yuksekdag *et al.* (2010) e da Sabir *et al.* (2010). Per quanto riguarda la resistenza all'acidità, 10 μ L di sospensione coltura *overnight* di ogni ceppo sono stati utilizzati per inoculare 990 μ L di tampone fosfato PBS (NaCl 9 g/L, Na₂HPO₄·2H₂O 9 g/L, KH₂PO₄ 1,5 g/L) a pH 6,2 (controllo) e a pH 2, pH 2,5 e pH 3 (PBS acidificato con HCl). Le sospensioni sono state incubate a 37 °C 2 ore, dopodiché si è proceduto alla conta tramite semina in piastre di MRS agar. Il tasso di sopravvivenza (Δ_{ac}) è stato determinato attraverso la valutazione del numero di cellule che rimanevano ancora vitali dopo un'incubazione a pH 2, 2,5 e 3 per 2 ore rispetto a un inoculo di pari concentrazione incubato a pH 6,2. Per ogni isolato sono stati valutati i valori di Δ_{2h} come segue:

$$\Delta_{2h} = (\log_{10} UFC/ml pH_{6,2}) - (\log_{10} UFC/mL pH_{ac})$$

dove $\log_{10} UFC/mL pH_{6,2}$ e $\log_{10} UFC/mL pH_{ac}$ erano pari rispettivamente al logaritmo decimale della conta vitale valutata dopo due ore di incubazione a pH 6,2 (controllo) e a pH 2, 2,5 e 3.

Per determinare la tolleranza alla bile, 10 μ L di coltura *overnight* sono stati utilizzati per inoculare, in micropiastre da 96 pozzetti con fondo a U, 190 μ L di brodo MRS (controllo) e di MRS addizionato di oxgall (Sigma, Milano) allo 0,15%, 0,3% e 0,5%. Le micropiastre sono state incubate a 37 °C per 48 ore in un lettore di micropiastre Sunrise (Tecan, Männedorf, Svizzera) e i singoli pozzetti sono stati letti a 630 nm ogni 60". La tolleranza degli isolati alla bile è stata determinata quantificando, nella curva di crescita controllo e nella curva in presenza di bile, l'area sottesa alla curva stessa; il grado di inibizione (%_{oxgall}) dovuto alla presenza di bile è stato espresso come segue:

$$\%_{oxgall} = 100 - [(area_{oxgall})/(area_{controllo}) \times 100]$$

2.2.3.2 Resistenza agli antibiotici

I ceppi di *Pediococcus* sono stati testati per valutare la capacità di resistere agli antibiotici secondo la metodica di diffusione in agar (NCCLS, 2003). Gli antibiotici utilizzati erano ampicillina (AMP, 2 μ g), ceftriaxione (CRO, 30 μ g), ciprofloxacina (CIP, 5 μ g), cloramfenicolo (C, 30 μ g), eritromicina (E, 15 μ g), gentamicina (CN, 10 μ g), kanamicina (K, 30 μ g), levofloxacina (LEV, 5 μ g), linezolid (LZD, 10 μ g), imi-

penem (IMI, 10 μ g), meticillina (MET, 5 μ g), netilmicina (NET, 30 μ g), penicillina G (P 1U.I.), rifampicina (RD, 30 μ g), streptomina (S, 10 μ g), teicoplanina (TEC, 30 μ g), tetraciclina (TE, 30 μ g), trimethoprim (TM, 5 μ g) e vancomicina (VA, 30 μ g).

Sono state allestite sospensioni, in 2 mL di soluzione fisiologica sterile (NaCl 9 g/L, pH 7), di ogni ceppo alla torbidità equivalente a 1 Mc Farland. Con ogni coltura è stato imbevuto un tampone sterile che è stato successivamente strisciato uniformemente su una piastra di Müller-Hinton Agar (Oxoid, Italia). In ciascuna piastra sono stati depositi 4 dischetti contenenti i rispettivi antibiotici (Oxoid, Italia) mediante un distributore automatico. Le piastre sono state quindi poste ad incubare a 30 °C per 48 ore. Dopo l'incubazione è stata eseguita la lettura delle piastre misurando il diametro degli aloni di inibizione.

2.2.3.3 Attività aminoacido-decarbossilasica

I ceppi sono stati testati per determinarne la capacità di decarbossilare gli aminoacidi e quindi di produrre ammine biogene secondo un protocollo messo a punto da Bover-Cid e Holzapfel (1999). Il test è stato suddiviso in due fasi: in una prima fase si è proceduto all'attivazione di ciascun ceppo attraverso 3 cicli successivi di crescita in brodo MRS modificato addizionando lo 0,1% di ogni singolo aminoacido (tirosina base libera, istidina cloridrato, ornitina cloridrato e lisina cloridrato, Sigma, Milano) e lo 0,005% di piridossale-5-fosfato (Sigma, Milano). Questa fase è stata allestita in micropiastre sterili da 96 pozzetti inoculando ogni pozzetto contenente 100 μ L di terreno di attivazione con 10 μ L di coltura *overnight* del ceppo in esame. I passaggi successivi erano effettuati inoculando 100 μ L di terreno di attivazione fresco con 10 μ L di coltura provenienti dalla fase precedente. Le micropiastre venivano incubate a 30 °C per 24 ore.

Nella seconda fase un'ansata di ogni ceppo attivato per ogni singolo aminoacido veniva strisciata su piastra contenente il terreno agarizzato addizionato di ognuno dei rispettivi aminoacidi. Le piastre venivano quindi incubate a 30 °C per 4 giorni. Il risultato positivo per la decarbossilazione di istidina, lisina e ornitina era indicato dal viraggio del terreno che passava da una colorazione giallo-verde a una blu-viola intenso; nel caso della decarbossilazione della tirosina il risultato positivo era determinato dalla comparsa di un alone trasparente attorno alla colonia dovuto alla scomparsa del precipitato di tirosina. La verifica della corretta esecuzione del test veniva effettuata testando in parallelo dei ceppi-controllo appartenenti alla collezione del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, e di cui erano note le attività decarbossilasiche nei confronti dei singoli aminoacidi (Marino *et al.*, 2000).

2.2.3.4 Formazione di biofilm

Il test di formazione di *biofilm* è stato effettuato tramite un saggio in micropiastra da 96 pozzetti secondo il protocollo messo a punto da Christensen *et al.* (1985) modificato come segue. In ogni pozzetto di una micropiastra a 96 pozzetti sono stati dispensati 100 μ L di brodo MRS, che sono stati inoculati con 10 μ L di coltura microbica *overnight*; per ogni isolato sono stati riempiti quattro pozzetti e per ogni micro-

piastra quattro pozzetti sono stati utilizzati come controllo (brodo MRS non inoculato). Le micropiastre sono state poste ad incubare a 30 °C per 48 ore. Alla fine dell'incubazione il contenuto di ogni pozzetto è stato aspirato e ogni pozzetto è stato lavato per 5 volte con 200 µL di acqua sterile per rimuovere tutte le cellule non aderite. Le micropiastre sono state quindi poste ad asciugare per 60' a temperatura ambiente. Ogni pozzetto è stato quindi riempito con 200 µL di cristalvioletto all'1% (Merck, Darmstadt, Germania) e colorato a 20 °C per 30'. Successivamente il colorante è stato aspirato, i pozzetti lavati per 5 volte con 200 µL di acqua sterile e le micropiastre poste ad asciugare per 60' a temperatura ambiente. Il colorante legato alle cellule adese alle micropiastre è stato solubilizzato con 150 µL di alcol etilico al 96% (Sigma, Milano) e le micropiastre sono state incubate a temperatura ambiente per 30'. Le micropiastre sono quindi state poste in un lettore di micropiastre Sunrise per la lettura dell'assorbanza a 570 nm. L'interpretazione dei risultati è stata fatta secondo quanto riportato da Christensen *et al.* (1985).

2.2.3.5 Valutazione della capacità di produrre batteriocine

Tale prova è stata eseguita utilizzando il metodo dell'agar diffusione mediante spot, come descritto da Schillinger e Lücke (1989). Come microrganismi indicatori sono stati utilizzati i seguenti ceppi: *Listeria monocytogenes* DSMZ 20600, *Staphylococcus aureus* DSMZ 20231, *Bacillus cereus* DSMZ 4222, *Salmonella enteritidis* DSMZ 9898, *Enterococcus faecium* DSMZ 20477, *Enterococcus faecalis* DSMZ 20478, *Streptococcus thermophilus* DSMZ 20617 e *Lactobacillus brevis* DSMZ 20054. I ceppi di *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus* e *Salm. enteritidis* sono stati inoculati in BHI medium (Oxoid, Milano) e fatti crescere a 37 °C per 24 ore, i ceppi di *Lb. brevis* e *St. thermophilus* sono stati inoculati rispettivamente in brodo MRS e brodo M17 contenente lattosio al 10% (Oxoid, Milano) e incubati a 30 °C e 37 °C per 24 ore.

Su piastre preparate con BHI medium contenente 6,5 g/L di Agar Bacteriological (Oxoid, Milano), inoculate con ognuno dei microrganismi indicatori alla concentrazione di ca. 10⁵ UFC/mL, sono stati praticati dei fori (spot) di 5 mm di diametro. I ceppi di pediococchi sono stati fatti crescere in brodo TGE (Papagianni e Anastasiadou, 2009) a 30 °C per 24 ore. Successivamente 100 µL di brodocoltura sono stati aggiunti in ogni spot e le piastre sono state poste per un'ora a 4°C, quindi a 30°C per 24 ore. Come controllo positivo è stato utilizzato un ceppo di *Enterococcus faecium* isolato in una precedente sperimentazione.

2.2.4 Caratterizzazione genotipica

Per valutare le differenze genotipiche inter- e intra-specie degli isolati, si è proceduto all'applicazione di tre differenti metodiche di biologia molecolare.

2.2.4.1 Amplificazione della Regione Spaziatrice 16S-23S

Gli estratti sono stati sottoposti ad amplificazione via PCR della regione spaziatrice 16S-23S, che è un metodo che trova applicazione nello studio di polimorfismi di lunghezza e sequenza presenti nelle specie e nei generi microbici (García-Martínez *et al.*, 1999). Tutte le reazioni di amplificazione sono state condotte in termociclatore OneGradient in un volume finale di 20 μ L. Il mix di reazione era così costituito: $MgCl_2$ 1,5 mM (Fermentas, Vilnius, Lituania), dNTP's 1,5 mM ognuno (Applied Biosystem, Monza, Italia), primers L1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') e G1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') 0,5 μ M ognuno, Taq-DNA polimerasi 1 UI/PCR (Fermentas, Vilnius, Lituania), DNA 100 ng. Il ciclo di amplificazione è stato il seguente: denaturazione iniziale a 94 °C per 5', 25 cicli di denaturazione a 94 °C per 1', *annealing* a 55 °C per 7' ed estensione a 72 °C per 2', estensione finale a 72 °C per 7'. I prodotti di amplificazione sono stati separati per elettroforesi a 110 volt per 40' su gel di agarosio (Gelly Phor® LE Euroclone, Milano) al 2 % addizionato di etidio bromuro 0,25 μ g/mL in 0,5 x TBE (Sigma, Milano).

Le immagini dei gel sono state analizzate al transilluminatore e digitalizzate utilizzando il software GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK). I profili ottenuti sono stati successivamente elaborati con il software Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio) applicando il coefficiente di Dice e il metodo di raggruppamento UPGMA.

2.2.4.2 Rep-PCR

La caratterizzazione genotipica dei ceppi mediante la tecnica Rep-PCR è stata effettuata utilizzando il primer GTG_5 (GTGGTGGTGGTGGTG); l'amplificazione è stata condotta come descritta da Khan *et al.* (2010) in termociclatore OneGradient in un volume finale di 25 μ L. I prodotti di amplificazione sono stati separati per elettroforesi (80 V per 3 ore) su gel di agarosio all'1,5%; il gel è stato quindi colorato per 30' in 0,5x TBE addizionato di etidio bromuro 0,5 μ g/mL. Le immagini dei gel sono state digitalizzate utilizzando il software GeneSnap (Syngene, Cambridge, UK). I profili ottenuti sono stati successivamente elaborati con il software Gel Compar II (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio) applicando il coefficiente di Dice e il metodo di raggruppamento UPGMA.

2.2.4.3 Pulsed Field Gel Electrophoresis

1,5 mL di coltura *overnight* di ogni ceppo sono stati centrifugati a 8000 rpm per 5' e il pellet ottenuto è stato lavato con 0,9 mL di NaCl (Sigma, Milano) 1M- Tris HCl 10 mM a pH 7,6; le cellule sono state quindi recuperate per centrifugazione a 8000 rpm per 10'. Successivamente si è proceduto come descritto da Simpson *et al.* (2002).

Ogni *plug* è stato trattato *overnight* con 20 U di *ApaI* (30 °C), *SfiI* (50 °C) e *SmaI* (37 °C) (Fermentas, Vilnius) in un volume finale di 100 μ L. Dopo il lavaggio dei *plugs* per eliminare l'eccesso di enzima i frammenti sono stati separati tramite elettroforesi in campo pulsato in cella CHEF DR-II PFGE (BioRad, Segrate, Milano) su gel di agarosio (Chromosomal Grade Agarose, BioRad) all'1,2% in tampone TBE 0,5

x; le condizioni di corsa erano le seguenti: 14 °C, 20 ore, 6,0 v/cm, switch 1-20. Il marker di peso molecolare utilizzato era MidRange II PFGE Marker (New England BioLabs, Hitchin, UK). I gel sono stati quindi colorati con etidio bromuro 0,5 mg/L (Sigma, Italia).

L'elaborazione statistica dei profili di restrizione è stata fatta con il software GelCompar II (Applied Maths BVBA, Belgio) utilizzando l'analisi di raggruppamento con l'applicazione del coefficiente di Dice e il metodo di raggruppamento UPMGA.

RISULTATI E DISCUSSIONE

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il genere *Pediococcus* comprende specie microbiche che sono coinvolte nella fermentazione di diverse tipologie di matrici alimentari, sia di origine animale che vegetale. Nonostante ciò, i dati disponibili in letteratura sono limitati a un numero poco consistente di isolati, tale da non consentire un approfondimento sufficiente della biodiversità genotipica e fenotipica dei pediococchi. In questa sperimentazione si è quindi effettuata una caratterizzazione di una collezione di 111 ceppi di *Pediococcus* isolati da diverse matrici, al fine di fornire una panoramica ad ampio spettro relativa ad aspetti fisiologici, genotipici e tecnologici.

3.1 IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI

In una prima fase della sperimentazione i ceppi sono stati identificati, prima a livello di genere e quindi a livello di specie, attraverso tecniche di biologia molecolare basate sulla PCR. Tutti i 111 ceppi sono risultati appartenere al genere *Pediococcus*, in quanto la reazione PCR ha prodotto un'unica banda, corrispondente a circa 701 bp, come riportato da Pfannebecker *et al.* (2008) (Figura 7). Il DNA di *Lactobacillus brevis* CECT 5354, *Lactobacillus plantarum* DSMZ 10492, *Lactobacillus delbrueckii* CECT 282, *Lactobacillus buchnerii* CECT 4111 e *Lactococcus lactis* DSMZ 20069, utilizzato in questa fase come controllo negativo, non è stato amplificato.

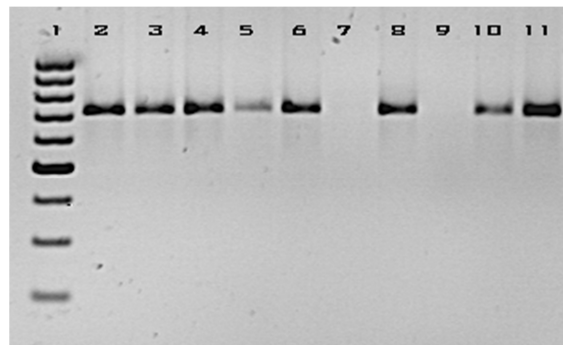


Figura 7. PCR specifica per *Pediococcus* spp. lane1 GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, Lituania), lane 2 *Pediococcus pentosaceus* DSMZ 20336, lane 3 *Pediococcus acidilactici* DSMZ 20238, lane 4 *Pediococcus inopinatus* DSMZ 20285, lane 5 *Pediococcus stilesii* DSMZ 18001, lane 6 *Pediococcus parvulus* CECT 4794, lane 7 *Lactobacillus brevis* CECT 5354, lane 8 *Pediococcus ethanolidurans* LMG 23957, lane 9 *Lactococcus lactis* 20069 DSMZ, lane 10 *Pediococcus parvulus* BR 1, lane 11 *Pediococcus pentosaceus* BFE 945.

L'amplificazione parziale del gene 16S rRNA ha prodotto amplificati di ca. 640 bp, che sono stati sequenziati e le sequenze sono state allineate all'interno del database Genbank. Tutte le sequenze hanno presentato un valore di *maximum identity* (omologia) superiore al 98% (Carraro *et al.*, 2011). L'allineamento delle sequenze dei ceppi appartenenti alle collezioni internazionali DSMZ, CECT e LMG ha confermato l'appartenenza alle rispettive specie.

La maggior parte dei ceppi isolata da matrici alimentari e non alimentari è risultata appartenere alla specie *P. pentosaceus*, seguita da *P. parvulus* e *P. acidilactici* (Figura 8). Di fatto queste specie sono quelle più frequentemente isolate dagli alimenti (Immerstrand *et al.*, 2010).

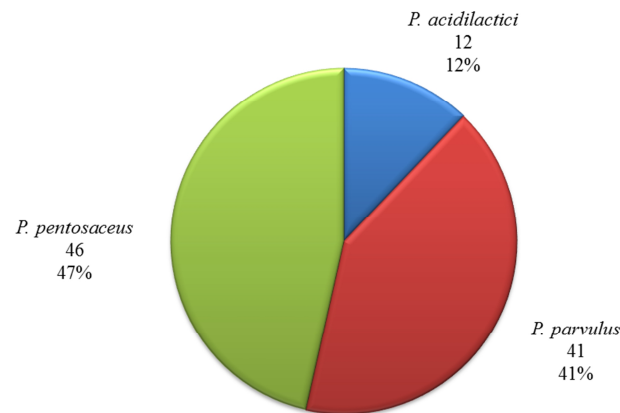


Figura 8. Identificazione delle specie di *Pediococcus* isolate

In Figura 9 è riportata la distribuzione delle specie isolate dalle diverse fonti. Come si può osservare, la specie *P. parvulus* è stata isolata solo dai vegetali fermentati, mentre la presenza di *P. pentosaceus* è stata evidenziata in tutte le tipologie di campioni testati. Questa specie ha un habitat ubiquitario, in quanto è stata isolata da prodotti fermentati come salami, crauti, vegetali fermentati e mucose intestinali (Plengvidhya *et al.*, 2007). In questo studio questa specie è stata evidenziata, oltre che negli alimenti, anche nell'acqua di risciacquo di un impianto di produzione di birra artigianale. Per quanto riguarda *P. acidilactici*, questa specie è risultata presente nei vegetali fermentati, nei prodotti lattiero-caseari, negli impasti acidi e nei campioni di origine umana.

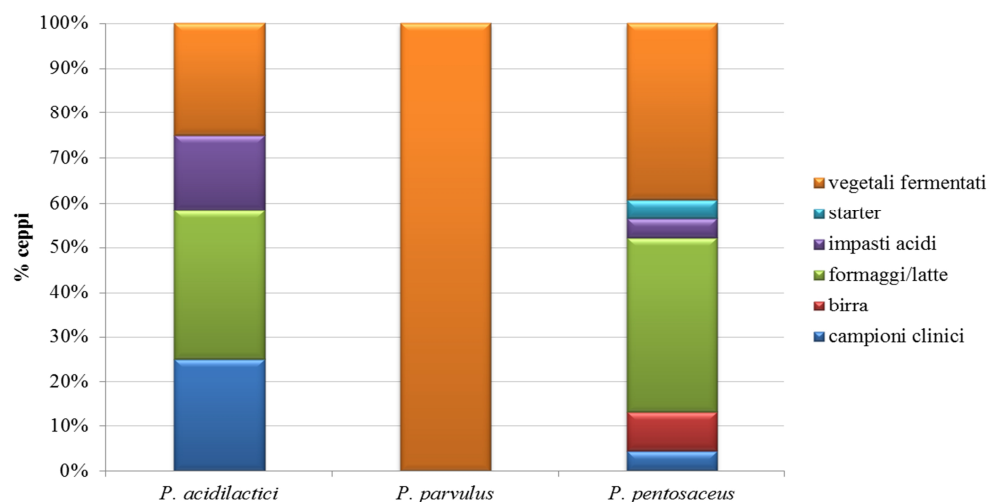


Figura 9. Distribuzione di *P. pentosaceus*, *P. parvulus* e *P. acidilactici* isolati da diverse fonti

Gli stessi ceppi identificati attraverso sequenziamento sono stati testati anche attraverso un protocollo multiplex PCR specie-specifico, recentemente messo a punto da Pfannebecker *et al.* (2008) al fine

di verificare l'applicabilità di una metodica di identificazione più rapida e meno costosa rispetto al sequenziamento. Dai risultati è emerso tuttavia che le specie *P. pentosaceus* e *P. parvulus* non risultavano distinguibili attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio, poiché presentavano dei prodotti di amplificazione rispettivamente di 1647 bp e 1517 bp, come mostrato in Figura 10. Le altre specie si distinguevano tra loro poiché le bande avevano dei pesi molecolari sufficientemente diversi.

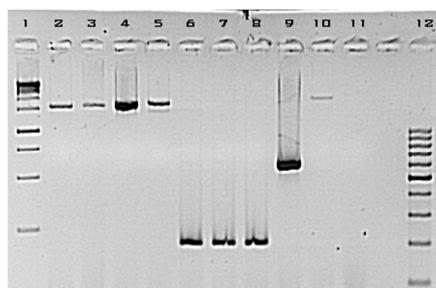


Figura 10. PCR multiplex specie-specifica. Lanes 1 e 12 GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas, Lituania), lane 2 ceppo *P. parvulus* BR 155, lane 3 ceppo *P. parvulus* BR 156, lane 4 ceppo *P. pentosaceus* 1637 FR, lane 5 ceppo *P. pentosaceus* 1642 FR, lane 6 ceppo *P. acidilactici* L 511, lane 7 ceppo *P. acidilactici* L 200, lane 8 *P. acidilactici* DSMZ 20238, lane 9 *P. clausenii* DSMZ 14800, lane 10 *P. stilesii* DSMZ 18001.

3.2 CARATTERIZZAZIONE BIOCHIMICA E FIOLOGICA DI *PEDIOCOCCUS* SPP.

3.2.1 Caratterizzazione biochimica

In questa fase della sperimentazione i ceppi sono stati testati per la capacità di crescere a diverse temperature, pH e concentrazioni saline, nonché per la capacità di fermentare diversi zuccheri. Queste prove sono state utilizzate sia a scopo identificativo che per caratterizzare i ceppi (Holzapfel *et al.*, 2006, 2009), come riassunto in Tabella 4.

Tabella 4. Caratteristiche fenotipiche delle specie appartenenti al genere *Pediococcus* (Holzapfel *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006)

caratteristica	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. ethanolidurans</i>	<i>P. inopinitus</i>	<i>P. stilesii</i>	<i>P. cellicola</i>	<i>P. clausenii</i>
crescita a								
35 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	-	+	+	-	+	+	+
50 °C	-	-	+	-	-	-	-	nd
crescita a								
pH 4,2	+	+	+	+	+	+	+	nd
crescita a								
4% NaCl	+	+	+	-	+	+	+	nd
6,5% NaCl	+	+	+	+	d	+	+	nd
8% NaCl	+	-	+	-	-	+	+	nd
10% NaCl	d	-	-	-	-	-	-	nd

nd, non determinato; d, debole

In Tabella 5 sono riportati i risultati di questa fase di studio. Per quanto riguarda le specie maggiormente rappresentate (*P. pentosaceus*, *P. parvulus* e *P. acidilactici*) in alcuni casi si sono evidenziate delle risposte atipiche, legate soprattutto alla capacità di crescere a 50 °C e alle elevate concentrazioni saline.

Queste incongruenze sono state riscontrate soprattutto all'interno della specie *P. parvulus*: 34 ceppi su 41 crescevano a temperature uguali o superiori a 40 °C, considerata temperatura limite di crescita per questa specie (Holzapfel *et al.*, 2006, 2009). Inoltre 12 ceppi avevano un comportamento atipico in presenza dell'8% di NaCl.

Tabella 5. Profili fenotipici dei ceppi di *Pediococcus* (i numeri in rosso sono riferiti ai ceppi atipici)

caratteristica	<i>P. pentosaceus</i> (n=46)	<i>P. parvulus</i> (n=41)	<i>P. acidilactici</i> (n=12)
crescita a			
35 °C	46	41	12
40 °C	45	33	12
45 °C	40	16	12
50 °C	1	2	6
crescita a			
pH 5	46	41	12
pH 4.2	42	41	11
pH 3.5	5	4	0
crescita a			
4% NaCl	46	41	12
6,5% NaCl	46	24	12
8% NaCl	40	11	12
10% NaCl	3	0	1

I ceppi appartenenti alle specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* hanno mostrato nel complesso un comportamento simile a quello descritto in bibliografia, se non con l'eccezione di qualche ceppo (ad esempio 3 isolati di *P. pentosaceus* crescevano a 50 °C). Questi comportamenti atipici relativi alle specie *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* sono stati evidenziati anche da altri autori (Benito *et al.*, 2007).

I ceppi di collezione *P. ethanolidurans* 23597 LMG, *P. stilesii* 18001 DSMZ, *P. inopinatus* 20285 DSMZ e *P. cellicola* 17757 DSMZ, utilizzati come ceppi controllo, hanno presentato un comportamento conforme a quanto riportato in bibliografia. Per quanto riguarda la specie *P. claussenii*, non ci sono dati disponibili in letteratura relativi al comportamento di questa specie nelle diverse condizioni.

La capacità di crescere a pH acidi è risultata piuttosto diffusa all'interno della collezione, il che è correlato presumibilmente all'habitat di questo gruppo microbico, costituito per lo più dagli alimenti fermentati. Circa il 10% dei ceppi di *P. pentosaceus* e di *P. parvulus* crescevano anche pH 3,5, mentre nessun *P. acidilactici* riusciva a crescere in queste condizioni colturali. Questo dato non concorda con quanto osservato da Cai *et al.* (1999), che hanno evidenziato, peraltro in un numero molto limitato di ceppi di *P. acidilactici*, la capacità di crescere a pH 3,5.

Per quanto riguarda la capacità di crescita in presenza di diverse concentrazioni di NaCl, tutti i ceppi di *P. acidilactici* crescevano fino all'8%, mentre la specie più sensibile alla presenza di NaCl è risultata *P. parvulus*, nella quale già alla concentrazione del 6,5% 17 ceppi su 41 non erano in grado di crescere. La specie *P. pentosaceus* è risultata piuttosto tollerante alla presenza di NaCl nel mezzo di coltura, in quanto una gran parte dei ceppi cresceva fino a concentrazioni dell'8%. La diffusione del carattere di tol-

leranza all'NaCl all'interno del gruppo dei pediococchi è correlata soprattutto al loro utilizzo nelle fermentazioni vegetali, che vengono condotte in salamoia o in presenza di concentrazioni elevate di sale.

In Tabella 6 sono riportati i risultati relativi al confronto tra l'identificazione mediante sequenziamento e l'identificazione classica basata sulle caratteristiche fisiologiche (crescita a diverse temperature, pH e % NaCl). Per quanto riguarda i ceppi di collezione, tutti i profili fisiologici corrispondevano all'identificazione per via molecolare. Relativamente, tuttavia, ai ceppi isolati dalle varie fonti, per tutte e tre le specie considerate si è riscontrato un numero consistente di profili atipici. In particolare, per quanto riguarda *P. pentosaceus* il numero dei profili corrispondenti è risultato il più elevato (30 su 46 ceppi), seguito da *P. acidilactici* (5 su 12) e infine da *P. parvulus* (2 su 41).

Tabella 6. Confronto tra l'identificazione mediante sequenziamento e l'identificazione classica basata sulle caratteristiche fisiologiche (i numeri in rosso sono riferiti ai ceppi atipici)

identificazione 16S	identificazione biochimica					atipico	totale
	<i>P. parvulus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i>	<i>P. ethanolidurans</i>	<i>P. inopinatus</i>		
<i>P. parvulus</i>	3	1	8	4	6	19	41
<i>P. acidilactici</i>		5	6			1	12
<i>P. pentosaceus</i>		1	36	5		4	46

3.2.2 Pattern degli zuccheri fermentati

Tutti i ceppi, sia quelli ricavati da isolamenti che quelli derivanti da collezioni internazionali, sono stati testati per la capacità di fermentare 22 zuccheri. Questi test sono stati condotti sia per verificare la rispondenza dei caratteri a quanto riportato dalla letteratura, sia ai fini di una caratterizzazione fisiologica. Nessun ceppo è stato in grado di fermentare l'arabinosio (eccetto i due ceppi di *P. pentosaceus* di collezione), l'adonitolo e l'eritritolo. Questo dato concorda con quanto indicato su ceppi di origine alimentare (Dolezil e Kirsop, 1977), mentre per quanto riguarda i ceppi di origine clinica queste attività fermentative sono risultate presenti sia nella specie *P. acidilactici* che *P. pentosaceus* (Barros *et al.*, 2001). Gli zuccheri fermentati dalla maggior parte dei ceppi sono risultati ribosio, trealosio, glucosio, cellobiosio, mannosio, galattosio e fruttosio (Tabella 7). Gli zuccheri dulcitolio, glicerolo, mannitolo, melezitiosio e sorbitolo sono stati fermentati da un numero limitato di isolati appartenenti alle specie *P. parvulus* e *P. pentosaceus*.

Tabella 7. Pattern degli zuccheri fermentati dai ceppi di *Pediococcus* spp.

specie	ara	rib	tre	mal	xil	glu	ram	lat	cel	raf	sac	man	gal	fru	mel
<u>isolati</u>															
<i>P. pentosaceus</i>	0	45	46	41	26	46	29	37	41	21	24	42	37	46	23
<i>P. parvulus</i>	0	18	18	15	4	19	12	10	36	15	10	16	32	16	12
<i>P. acidilactici</i>	0	9	11	5	6	10	5	6	9	1	3	9	9	11	2

<u>collezioni</u>															
<i>P. damnosus</i>	0	1	2	2	1	2	1	2	2	0	0	2	1	1	0
<i>P. acidilactici</i>	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
<i>P. pentosaceus</i>	2	2	2	2	1	2	0	1	1	1	1	2	1	2	1
<i>P. parvulus</i>	0	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1
<i>P. ethanolidurans</i>	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>P. inopinatus</i>	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
<i>P. stilesii</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
<i>P. cellicola</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
<i>P. clausenii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0

ara, arabinosio; rib, ribosio; tre, trealosio; mal, maltosio; xil, xilosio; glu, glucosio; ram, ramnosio; lat, lattosio; cel, cellobiosio; raf, raffiniosio; sac, saccarosio; man, mannosio; gal, galattosio; fru, fruttosio; mel, melibiosio.

Un'interessante caratteristica riscontrata tra gli isolati è stata la capacità di fermentare il lattosio, presente in 53 su 99 ceppi isolati dai campioni di origine alimentare e clinica. Secondo quanto riportato da Holzapfel *et al.* (2006) questa attività metabolica dovrebbe essere assente nella specie *P. parvulus* e presente nella specie *P. pentosaceus*. Il 25% dei ceppi di *P. parvulus* isolati in questa sperimentazione risulterebbe "atipico" per quanto riguarda questa caratteristica metabolica, la cui presenza risulta tuttavia particolarmente interessante nel contesto delle fermentazioni lattiero-casearie finalizzate alla produzione di formaggi freschi, dove le temperature in fase di caseificazione sono mantenute attorno ai 30 °C (Kneifel *et al.*, 1992). Alcuni autori hanno evidenziato la capacità dei pediococchi di impartire caratteristiche organolettiche positive ai formaggi (Bhowmik e Marth, 1990a).

Se si confrontano i risultati ottenuti dall'identificazione attraverso il sequenziamento con i profili biochimici riportati in letteratura (Holzapfel *et al.*, 2006, 2009) si osservano numerose incongruenze all'interno delle specie *P. pentosaceus*, *P. parvulus* e *P. acidilactici*. Secondo i criteri riportati nell'edizione del 2009 del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, nessun ceppo identificato come appartenente alla specie *P. pentosaceus* possiede il profilo tipico della specie, mentre i criteri riportati nel Prokaryotes nell'edizione del 2006 consentirebbero l'assegnazione a questa specie di 12 su 46 ceppi. Nel caso della specie *P. acidilactici* solo un ceppo avrebbe le caratteristiche tipiche indicate in letteratura.

Data la difficoltà nell'assegnazione delle specie utilizzando i criteri fisiologici e biochimici indicati, è stato utilizzato un approccio statistico (analisi cluster) finalizzato all'identificazione di gruppi di ceppi omogenei per caratteristiche. I dati riguardanti la capacità di crescere in diverse condizioni di T, pH e % NaCl (11 variabili) sono stati trattati separatamente dal pattern degli zuccheri fermentati (20 variabili), per evitare che il peso dei due gruppi di variabili incidesse in maniera eccessivamente diversa sul risultato fi-

nale. I due cluster ottenuti sono riportati nella Figura 11 e nella Figura 12. Come si può osservare dalla figura 10, a una distanza di legame pari a 0,3 (cioè con un grado di similarità del 70%) è possibile individuare 5 gruppi distinti di ceppi. Due di questi gruppi (gruppo A e gruppo C) comprendono quasi esclusivamente ceppi appartenenti alla specie *P. parvulus*; il gruppo A comprende 8 ceppi che non crescono a 40 °C (caratteristica, questa, tipica della specie), il gruppo C comprende 13 ceppi “atipici”, in quanto crescevano a 40 °C, appartenenti alla specie *P. parvulus* e il ceppo di *P. clausenii* DSMZ 14800. Per quanto riguarda il gruppo più numeroso (gruppo B), esso è piuttosto eterogeneo, anche se comprende la maggior parte dei ceppi di *P. pentosaceus* e gran parte dei ceppi appartenenti alle collezioni internazionali. I gruppi D ed E sono rappresentati da pochi ceppi, per lo più comprendenti le specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*.

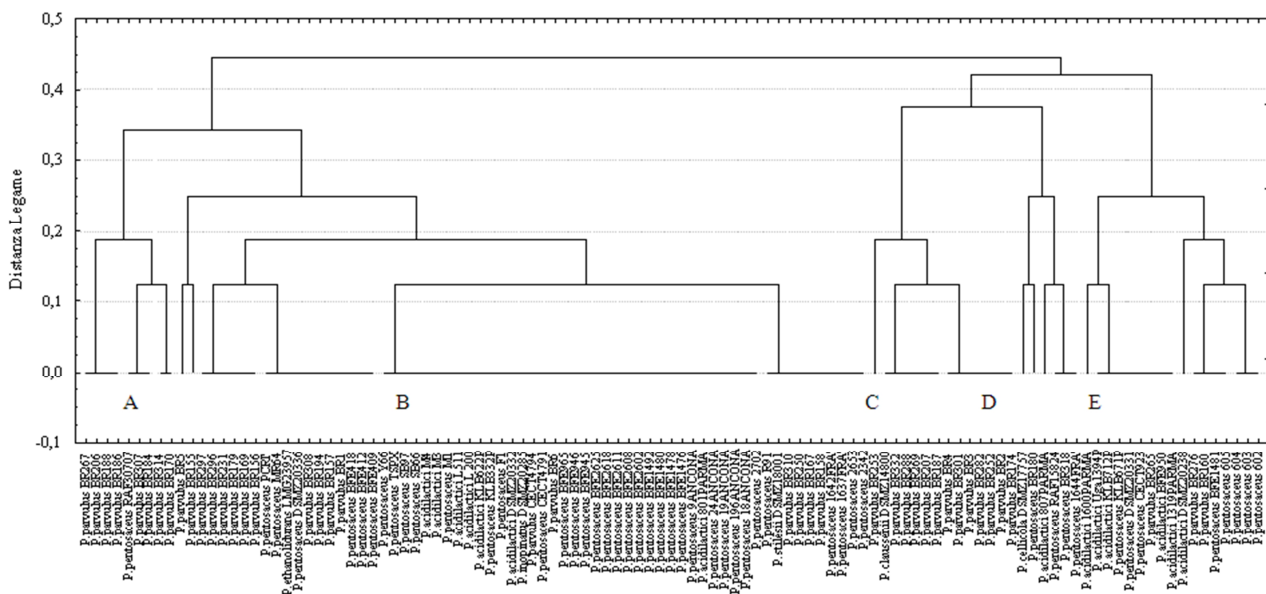


Figura 11. Cluster ottenuto dall'elaborazione della capacità di crescere in diverse condizioni di T, pH e % NaCl

Anche l'analisi cluster effettuata sul profilo degli zuccheri fermentati evidenzia un certo grado di biodiversità tra gli isolati: a una distanza di legame pari a 0,35 si distinguono tre gruppi caratterizzati dalla capacità di fermentare un numero più o meno elevato di zuccheri. In particolare il gruppo B comprende ceppi che fermentano da 2 a 6 zuccheri. All'interno del gruppo i ceppi sono rappresentati prevalentemente dalla specie *P. parvulus*, che dalla letteratura risulta essere caratterizzata dalla scarsa capacità di utilizzare le diverse fonti di carbonio. Un numero piuttosto consistente di ceppi (circa un terzo della collezione) fermentava da 12 a 17 zuccheri diversi, il che rappresenta una caratteristica piuttosto interessante ai fini di un utilizzo tecnologico, in quanto questi diversi substrati possono essere presenti in diverse matrici. Questa caratteristica quindi rende questi ceppi potenzialmente adatti ad esempio ad un utilizzo come starter oppure come probiotici ad uso sia umano che veterinario e zootecnico.

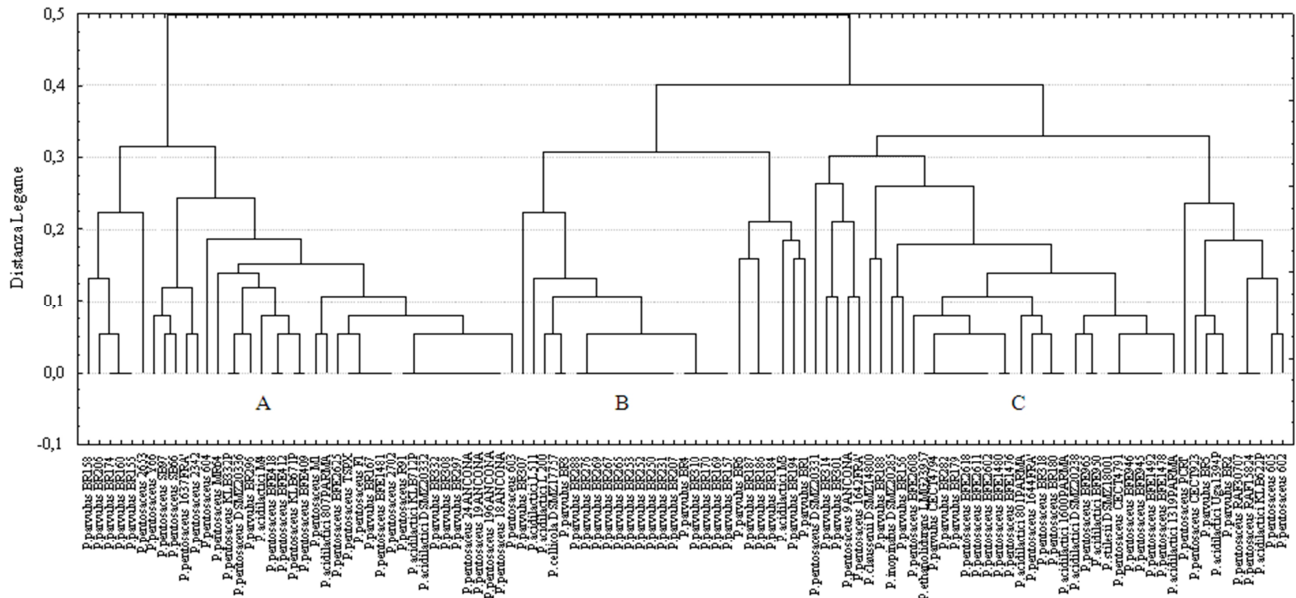


Figura 12. Cluster ottenuto dall'elaborazione del pattern degli zuccheri fermentati

3.3 CARATTERIZZAZIONE TECNOLOGICA

Tradizionalmente i batteri lattici sono implicati nella produzione di vegetali fermentati (cetrioli, crauti, olive), insaccati, prodotti lattiero caseari (come burro, formaggi, yogurt) e insilati, dove il loro ruolo è quello di promuovere la fermentazione degli zuccheri e indurre altre trasformazioni della materia prima, che risultano in un aumento della conservabilità del prodotto e che conferiscono attributi positivi alle caratteristiche reologiche e organolettiche. I moderni processi di produzione, che puntano alla sicurezza igienico-sanitaria, al prolungamento della *shelf-life* nonché al mantenimento di una qualità costante, impiegano ceppi singoli di batteri lattici, o miscele, accuratamente selezionate per ottenere processi di fermentazione controllati (Herrero *et al.*, 1996). In questo contesto la caratterizzazione di ceppi di *Pediococcus* spp. attraverso la valutazione dell'attività acidificante, la capacità di crescere a differenti temperature e l'attività proteolitica, può contribuire alla selezione di starters che consentano l'ottenimento di prodotti di elevata qualità.

3.3.1 Studio delle cinetiche di crescita a differenti temperature

Le cinetiche di sviluppo di *Pediococcus* spp. a 20 °C e a 30 °C sono state valutate misurando la curva di crescita in brodo MRS per via turbidimetrica. In Figura 13 sono riportate a titolo di esempio le curve di crescita di alcuni ceppi rappresentativi, caratterizzati da cinetiche di crescita molto diverse tra loro.

La stima dei punti ottenuti utilizzando l'equazione di Gompertz ha consentito di valutare, per ogni specifica condizione di crescita, i valori dei parametri *lag* (durata della fase di latenza, espressa in h) e v_{max} (velocità massima di crescita, espressa come unità di densità ottica all'ora, OD₆₃₀/h). Secondo molti

autori le equazioni sigmoidali sono in grado di descrivere bene la crescita dei batteri lattici nei mezzi liquidi (Dossmann *et al.*, 1996; Chowdhury *et al.*, 2007).

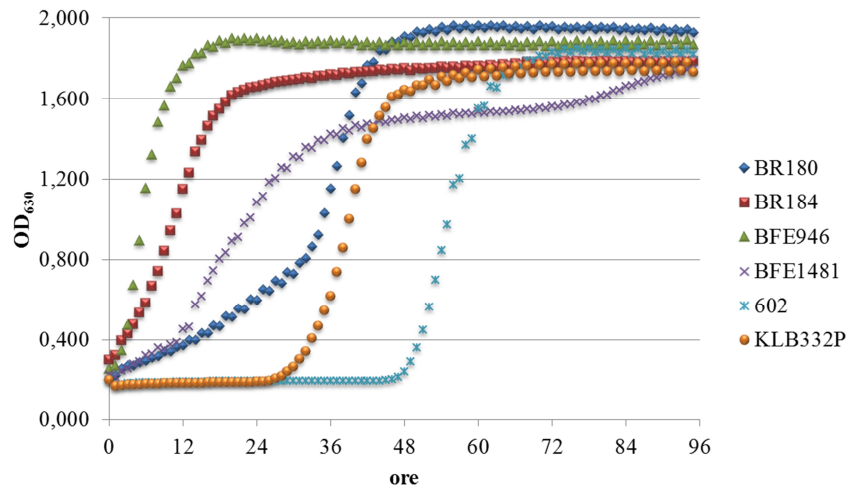


Figura 13. Esempi di curve di crescita di *Pediococcus* spp. a 20 °C

In Figura 14 è riportata la distribuzione dei valori di *lag* e di velocità massima registrati per i ceppi incubati a 20 °C. Da una prima osservazione si può rilevare come la nuvola di punti sia concentrata su valori di *lag* inferiori alle 10 ore, mentre i valori di velocità massima sono molto dispersi e compresi in un intervallo ampio di valori fino a 0,15 OD₆₃₀/h. La gran parte dei ceppi ha quindi una fase di latenza breve ma velocità massime di crescita variabili da ceppo a ceppo. Il 9% dei ceppi mostra un comportamento differente, caratterizzato da valori di *lag* elevati, da 20 a 50 ore, e una velocità massima che non supera 0,090 OD₆₃₀/h. I ceppi che presentavano i valori di *lag* più elevati derivavano per lo più da isolamenti di origine clinica.

Per quanto riguarda la specie *P. acidilactici*, circa metà dei ceppi presentava valori di *lag* bassi ed velocità massime di crescita su valori medio-alti, mentre l'altra metà si distribuiva su valori di *lag* alti e basse velocità massime; un comportamento analogo è stato riscontrato anche tra i ceppi di *P. pentosaceus*. Tutti i ceppi di *P. parvulus* avevano valori di *lag* inferiori alle 10 ore e una buona parte di essi valori di velocità massima elevati. Questo gruppo di ceppi risulterebbe piuttosto interessante da un punto di vista tecnologico, anche se in letteratura l'utilizzo di questa specie come starter non trova alcun riscontro. Infatti le tecnologie alimentari fanno spesso uso della specie *P. pentosaceus* in fermentazioni a temperature attorno ai 30-32 °C, mentre la specie *P. acidilactici* trova applicazione nella fermentazione degli insilati, dove vengono raggiunte le temperature elevate (Zhang *et al.*, 2000). La specie *P. parvulus*, invece, potrebbe trovare applicazione nel settore vegetale, dove peraltro il suo ruolo nelle fermentazioni naturali è riconosciuto (Maifreni *et al.*, 2004). Solitamente queste fermentazioni avvengono a temperature basse (attorno ai 18-20 °C), dove i ceppi con elevate velocità di crescita e *lag* brevi potrebbero dare un valido contributo al processo fermentativo.

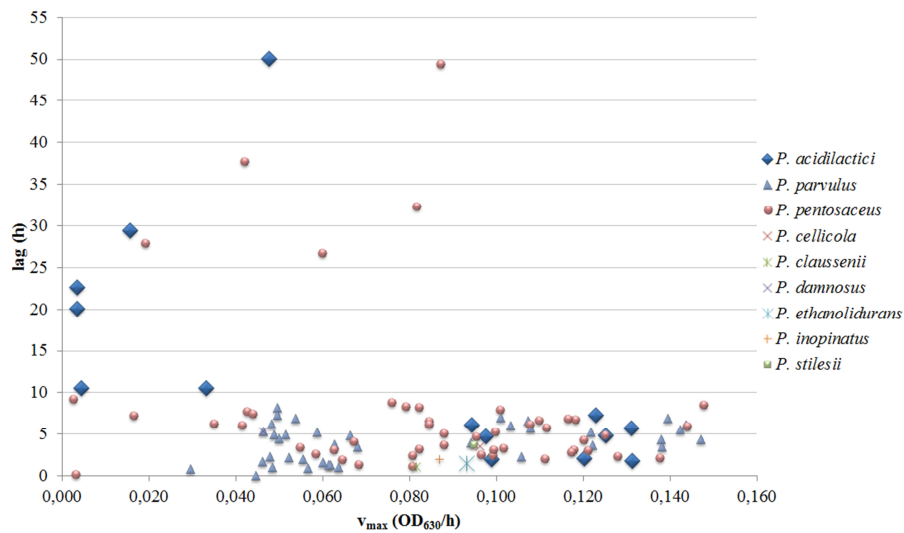


Figura 14. Distribuzione dei valori di lag e di velocità massima registrati per i ceppi incubati a 20 °C

In Figura 15 sono riportate a titolo di esempio alcune curve di crescita a 30 °C.

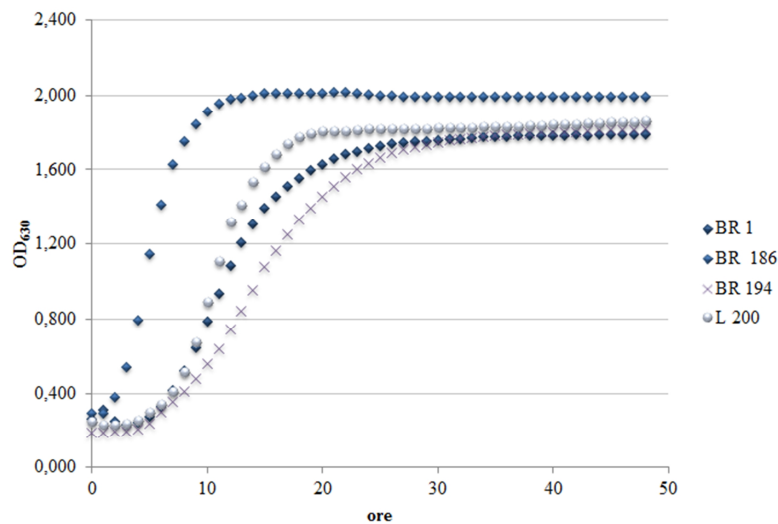


Figura 15. Esempi di curve di crescita di *Pediococcus* spp. a 30 °C

In Figura 16 sono rappresentati i valori di lag e v_{max} riferiti alla crescita a 30 °C. L'elaborazione dei dati cinetici ha messo in evidenza, com'era prevedibile, una netta riduzione dei valori di lag, con valori massimi intorno alle 8 ore, e un aumento della velocità massima. A 30 °C la specie *P. parvulus* dimostra una certa eterogeneità nei dati cinetici, mentre le specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* sono caratterizzati per lo più da valori di lag breve (entro le 5 ore) e velocità massime di crescita medio-elevate.

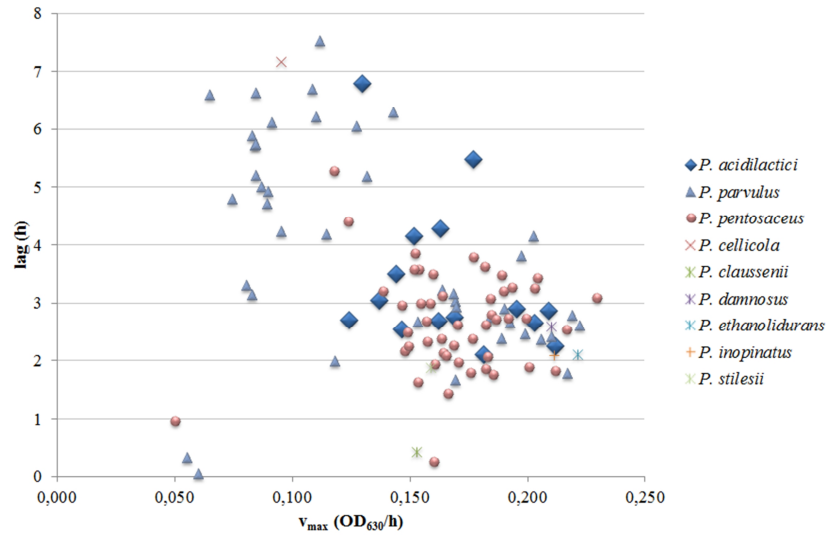


Figura 16. Distribuzione dei valori di lag e di velocità massima registrati per i ceppi incubati a 30 °C

Dal confronto dei dati delle specie nelle due condizioni di incubazione risulta che, mentre a 20 °C la specie *P. parvulus* mostra un comportamento simile per la maggior parte dei ceppi (limitatamente alla durata della fase lag) e le specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* mostrano un grado elevato di biodiversità fenotipica, a 30 °C si può osservare un comportamento speculare, più omogeneo per le specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* e maggiormente disperso per la specie *P. parvulus*. Questa osservazione potrebbe essere correlata alla fonte di isolamento dei ceppi di *P. parvulus*, cioè i vegetali fermentati, dove la temperatura di fermentazione è prossima ai 20 °C.

In linea generale si può comunque affermare che i microrganismi appartenenti al genere *Pediococcus* risentono della variazione della temperatura di incubazione non tanto in termini di velocità massima di crescita, quanto piuttosto di lunghezza della fase lag, come evidenziato dalla Figura 17.

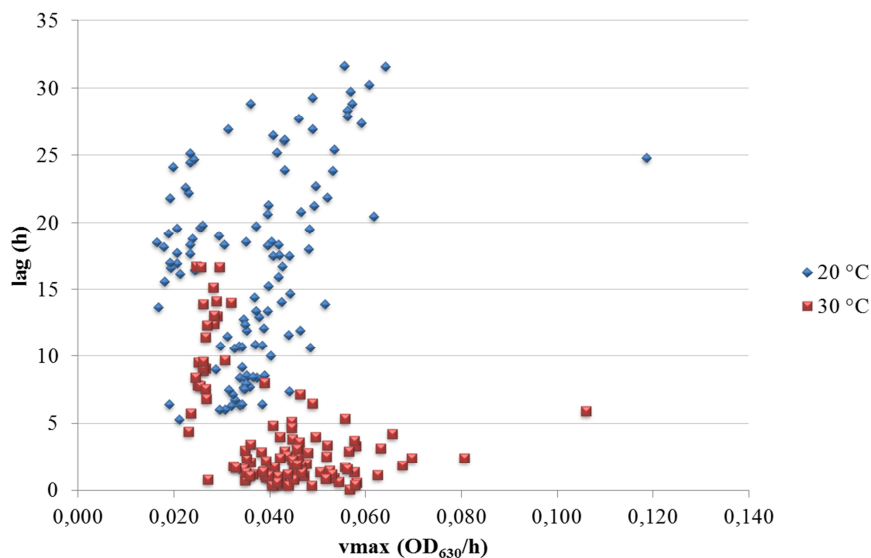


Figura 17. Distribuzione dei valori di lag e di velocità massima riferibili alla curva di crescita di tutti i ceppi a 20°C e 30 °C

3.3.2 Studio delle cinetiche di acidificazione

Sulla base delle curve di acidificazione dei ceppi testati a 20 °C e 30 °C si sono calcolati i parametri di velocità massima, intesa come variazione di unità di pH all'ora, e di fase *lag*. I ceppi quindi sono stati raggruppati in 3 classi individuate sulla base dei valori finali di pH raggiunti in 48 ore, che è una misura importante della capacità acidificante dei ceppi microbici.

In Figura 18 è rappresentata la distribuzione dei parametri cinetici di acidificazione dei ceppi incubati alla temperatura di 20 °C. La maggior parte dei ceppi si collocava in un intervallo di pH finale tra 4 e 4,5, che da un punto di vista tecnologico può essere un risultato piuttosto interessante, soprattutto in specifici settori (es. fermentazioni lattiero-casearie). Un numero limitato di ceppi portava il pH al termine della fermentazione a valori di $\text{pH} < 4,0$, che sono valori caratteristici del settore vegetale.

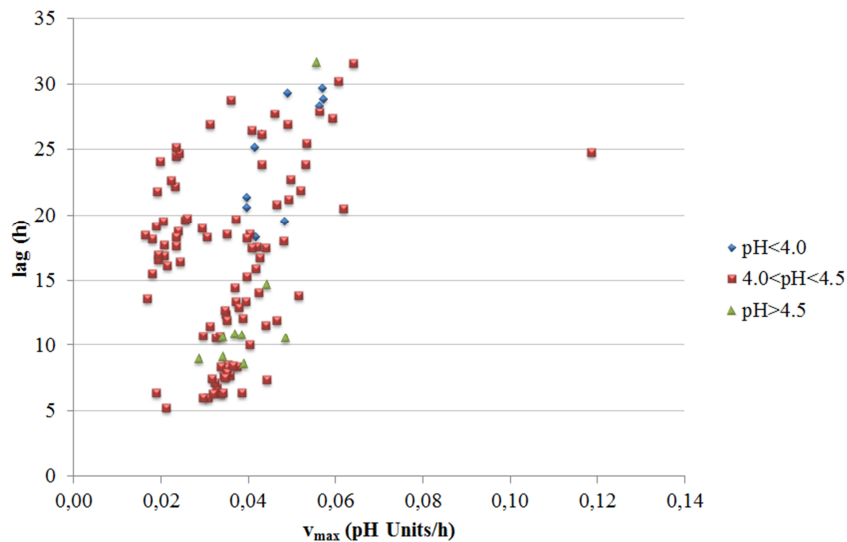


Figura 18. Distribuzione dei parametri cinetici di acidificazione dei ceppi incubati alla temperatura di 20 °C

Andando a valutare le cinetiche di acidificazione all'interno delle principali specie si può osservare che gli isolati appartenenti alla specie *P. acidilactici* non erano in grado di abbassare il pH a valori inferiori a 4 ed erano caratterizzati da basse velocità di acidificazione (Figura 19).

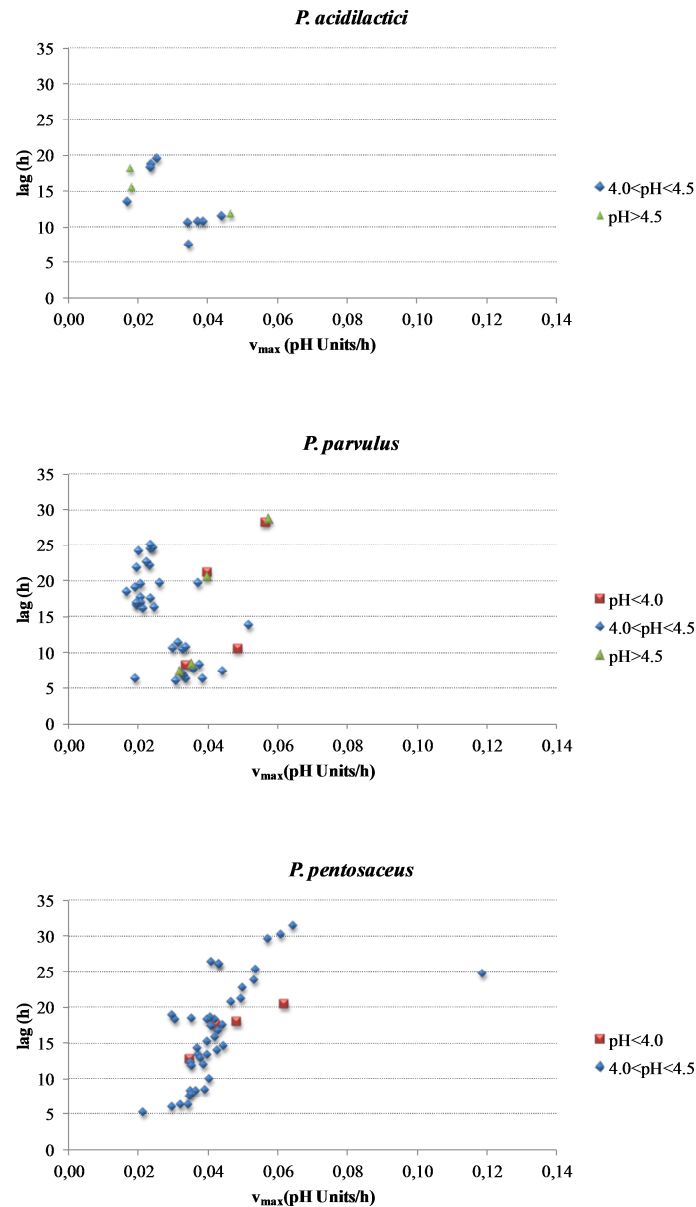


Figura 19. Distribuzione dei parametri cinetici di acidificazione dei ceppi incubati alla temperatura di 20 °C separati per specie

Gli isolati appartenenti alla specie *P. parvulus* mostravano un range di valori riferiti alla fase di latenza piuttosto ampio, tra le 5 e 30 ore, e lo stesso si può dire per la specie *P. pentosaceus*, dove è stata inoltre osservata una relazione lineare tra la lunghezza della fase *lag* e la velocità massima di crescita. All'interno di queste due specie sono stati individuati i ceppi che portavano i pH a fine fermentazione ai valori più bassi.

Per quanto riguarda le prove di acidificazione a 30 °C i ceppi si dividono più o meno in due gruppi, uno caratterizzato da elevato potere acidificante, basse velocità massime di crescita e *lag* medio-lunghe, l'altro gruppo caratterizzato da valori cinetici più omogenei, con velocità massime medio-alte e *lag* brevi (Figura 20).

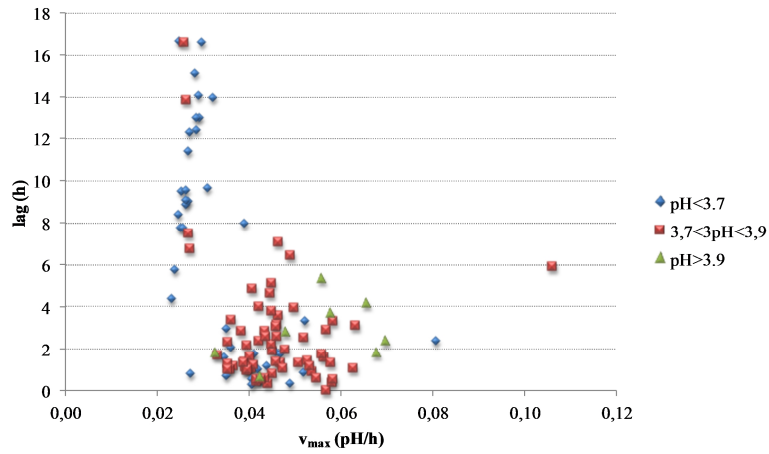


Figura 20. Distribuzione dei parametri cinetici di acidificazione dei ceppi incubati alla temperatura di 30 °C

Nello specifico, se si considerano i dati in relazione alle singole specie (Figura 21), le nuvole dei dati relative alle specie *P. parvulus* e *P. pentosaceus* risultano ben separate e caratterizzate da un punto di vista cinetico. Ai fini di un rapido abbassamento del pH alla temperatura di 30 °C la specie che meglio si adatta è *P. pentosaceus*, in quanto tutti i ceppi presentano una fase di latenza breve e una velocità massima medio-alta; questa specie infatti trova largo utilizzo come starter per insaccati ad acidificazione spinta (Raccach, 1996).

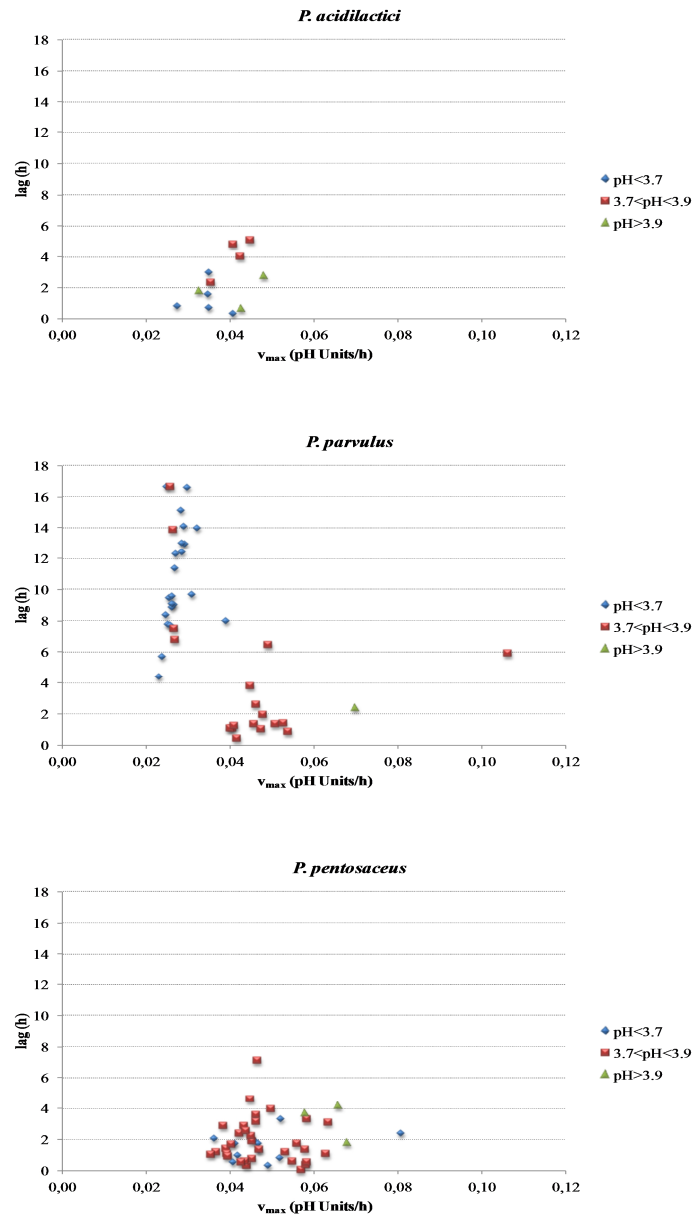


Figura 21. Distribuzione dei parametri cinetici di acidificazione dei ceppi incubati alla temperatura di 30 °C separati per specie

Osservando il complesso dei dati relativi alle cinetiche di acidificazione a 20 °C e 30 °C, si può concludere che l'innalzamento della temperatura ha un impatto forte soprattutto sulla lunghezza della fase *lag*, mentre la media delle velocità massime di acidificazione resta pressoché invariata (figura 21).

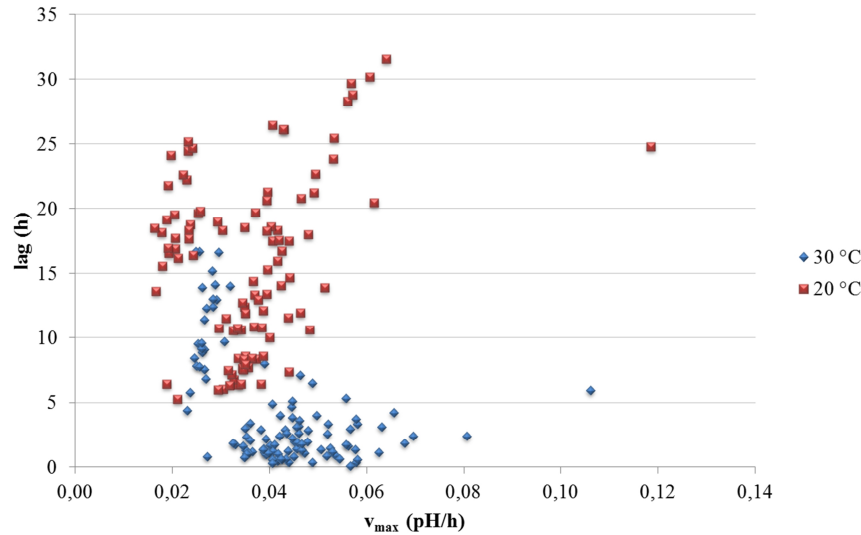


Figura 22. Distribuzione dei valori di *lag* e di velocità massima riferibili alla curva di acidificazione di tutti i ceppi a 20°C e 30°C

3.3.3 Attività proteolitica

L'attività proteolitica rilevata all'interno del genere *Pediococcus* è risultata piuttosto limitata, soprattutto se paragonata a quanto riportato in letteratura su altri generi di batteri lattici (Gardini *et al.*, 2001; Nieto-Arribas *et al.*, 2009). Solamente il 35% dei ceppi è risultato in grado di produrre quantità sensibili di glicina, con una maggior prevalenza di questa attività all'interno della specie *P. pentosaceus* (Figura 23). I dati ottenuti sulla specie *P. parvulus* confermano la sua scarsa attitudine alla proteolisi, come riportato in bibliografia (Davis *et al.*, 1988).

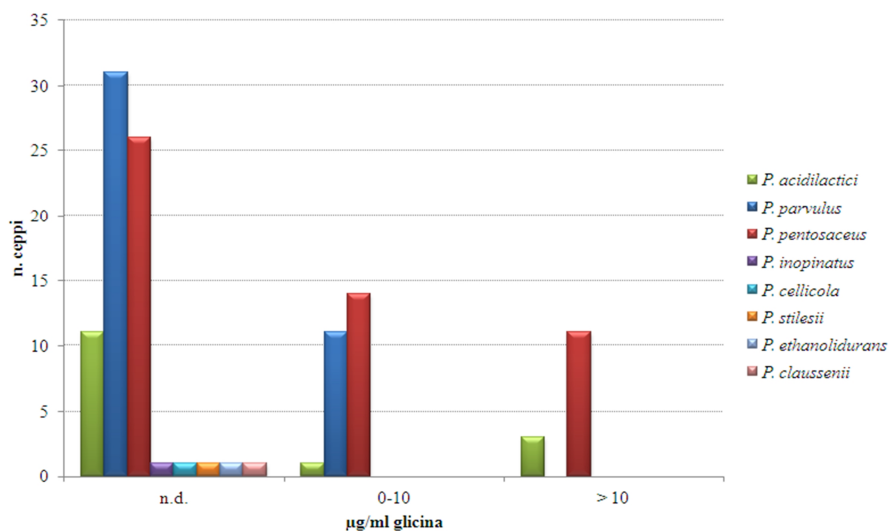


Figura 23. Attività proteolitica dei ceppi di *Pediococcus* spp.

I dati relativi all'attività proteolitica, che è un importante tratto con risvolti tecnologici, evidenziano un grado elevato di biodiversità, infatti questo carattere è più spesso legato al ceppo che alla specie (Drake *et al.*, 1999). Tuttavia è importante considerare anche che ceppi con un'elevata capacità proteolitica

non risultano essere sempre i più idonei all'utilizzazione come starters, infatti un'eccessiva proteolisi ad esempio nel settore lattiero-caseario può causare un'incontrollata produzione di peptidi che rilasciano amaro o altri composti indesiderati o modificano in maniera indesiderata la *texture* del prodotto (Buffa *et al.*, 2005).

Nei ceppi testati non è stata evidenziata alcuna significativa correlazione tra attività acidificante e proteolitica, come suggerito anche da altri autori (Fortina *et al.*, 1998), configurandosi piuttosto una situazione di presenza/assenza di queste due attitudini tecnologiche nelle specie microbiche isolate.

3.4 CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA DEGLI ISOLATI

In ambito alimentare, l'approfondimento delle caratteristiche genotipiche di un gruppo microbico è spesso legato allo studio di una collezione di ceppi numerosa, in quanto in questo modo è possibile evidenziare eventuali variabilità intra- ed inter-specie. Nell'ambito del genere *Pediococcus*, gli studi in questa direzione sono pochi e spesso riguardano un numero piuttosto limitato di ceppi appartenenti a poche specie (Nigatu *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2002; Pérez Pulido *et al.*, 2006). Per questo motivo è parso interessante, in questa sperimentazione, approfondire l'aspetto genotipico utilizzando diverse tecniche di biologia molecolare quali l'ISR-PCR, la Rep-PCR e la PFGE. I profili di amplificazione e macrorestrizione ottenuti sono stati elaborati utilizzando l'analisi *cluster*.

3.4.1 Analisi dei profili ISR-PCR

I profili di amplificazione ottenuti utilizzando l'analisi della regione spaziatrice 16S-23S avevano un numero di bande variabile da 2 a 9, con pesi molecolari compresi tra 250 bp e 3000 bp. E' stato osservato che la maggior parte degli isolati appartenenti alla specie *P. parvulus* era caratterizzato da un numero di bande comprese tra 6 e 9, mentre *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* ne avevano un numero inferiore, da 2 a 5. Un esempio di profili di amplificazione è rappresentato in Figura 24.

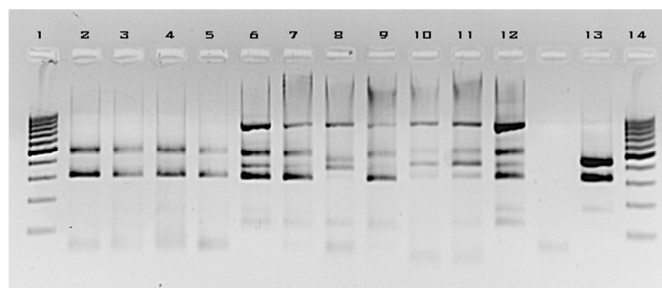


Figura 24. ITS-PCR di ceppi di *Pediococcus* spp. lanes 1 e 14 GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas, Lituania), lane 2 *P. acidilactici* M4, lane 3 *P. acidilactici* L200, lane 4 *P. acidilactici* L 511, lane 5 *P. pentosaceus* 9 AN, lane 6 *P. pentosaceus* 18 AN, lane 7 *P. pentosaceus* 19 AN, lane 8 *P. pentosaceus* 24 AN, lane 9 *P. pentosaceus* 196 AN, lane 10 *P. pentosaceus* P-CR, lane 11 *P. pentosaceus* RAF 15824, lane 12 *P. pentosaceus* RAF 30707, lane 13 *P. parvulus* BR 184.

In Figura 25 è riportato il dendrogramma relativo all'elaborazione dei profili di amplificazione ottenuti utilizzando la tecnica ISR-PCR. In una fase preliminare è stato valutato il livello minimo di ripetibili-

tà della tecnica, che è un parametro che consente di individuare il livello minimo di similarità oltre il quale due ceppi devono intendersi uguali. Tale valore era pari all'80% circa, che corrisponde a quanto indicato da altri autori come livello accettabile per tecniche analoghe (Giraffa *et al.*, 2004). A tale livello, tuttavia, il numero dei gruppi ottenuti era molto elevato e non forniva nessun tipo di indicazione in merito alla specie o alla fonte di isolamento. Al 55% di similarità venivano individuati 14 gruppi, di cui 9 contenevano ceppi appartenenti alla stessa specie. In particolare il gruppo IIX conteneva 31 ceppi di *P. parvulus* e il gruppo V 18 ceppi di *P. pentosaceus*. 5 gruppi contenevano uno o due ceppi di *P. pentosaceus*. I ceppi appartenenti alla specie *P. acidilactici* si distribuivano prevalentemente in gruppi contenenti più di una specie. All'interno dei vari gruppi è stato comunque osservato un elevato grado di biodiversità all'interno della medesima specie, soprattutto tra isolati provenienti dalla medesima matrice (es. gruppo IIX).

Il polimorfismo di lunghezza e di sequenza della regione spaziatrice tra i geni 16S e 23S è un valido strumento che può essere utilizzato al fine di identificare un gran numero di specie batteriche (Jensen *et al.*, 1993), anche se in letteratura l'applicazione di questa tecnica ha fornito risultati discordanti: per esempio, non è possibile separare tra loro tutte le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* (Villard *et al.*, 2000; Blaiotta *et al.*, 2003). Per quanto riguarda i batteri lattici, in alcuni casi la tecnica è stata applicata con successo (Dolci *et al.*, 2008), in altri casi essa non è stata discriminante (Li *et al.*, 2006). In riferimento al gruppo dei pediococchi questa tecnica non è mai stata utilizzata. Nel caso di questa sperimentazione, nonostante l'elevato grado di polimorfismo intra-specie, questa tecnica è stata in grado di raggruppare in cluster distinti gran parte dei ceppi appartenenti alle specie *P. parvulus* e *P. pentosaceus*.

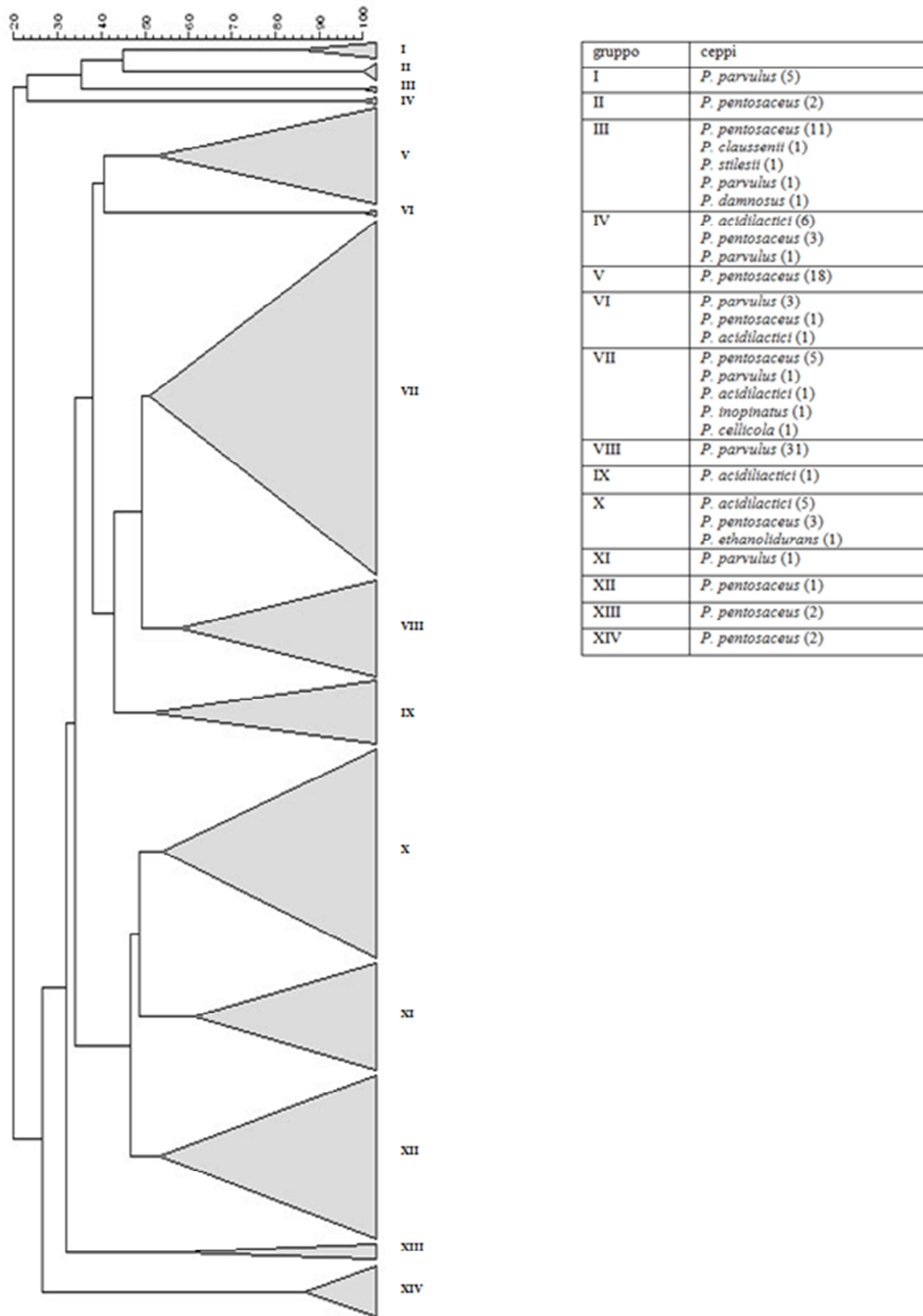


Figura 25. Dendrogramma ricavato dall'analisi dei profili ottenuti dalla tecnica ITS-PCR

3.4.2 Analisi dei profili Rep-PCR

L'amplificazione degli isolati con il primer GTG₅ ha prodotto pattern con un numero di bande variabile da 10 a 16 (Figura 26) con pesi molecolari compresi tra 250 bp e 5000 bp.

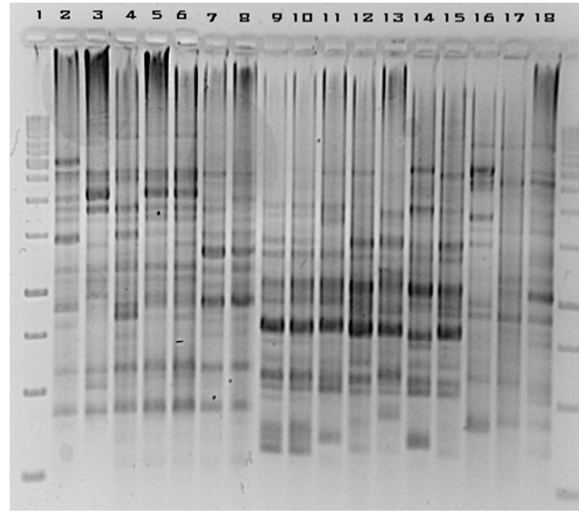


Figura 26. Rep PCR di *Pediococcus* spp. Lanes 1 e 19 GeneRuler 1kb DNA ladder (Fermentas, Lituania), lane 2 *P. pentosaceus* BFE 1492, lane 3 *P. pentosaceus* BFE 2602, lane 4 *P. pentosaceus* BFE 2608, lane 5 *P. pentosaceus* BFE 2618, lane 6 *P. pentosaceus* BFE 2611, lane 7 *P. pentosaceus* KLB 33-2P, lane 8 *P. pentosaceus* KLB 62-1P, lane 9 *P. acidilactici* KLB 67-1P, lane 10 *P. acidilactici* KLB 72-2P, lane 11 *P. acidilactici* UGA 139-4P, lane 12 *P. pentosaceus* 9AN, lane 13 *P. pentosaceus* 18 AN, lane 14 *P. pentosaceus* 24 AN, lane 15 *P. parvulus* BR 196, lane 16 *P. parvulus* BR 301, lane 17 *P. damnosus* DSMZ 20331, lane 18 *P. parvulus* DSMZ 20332.

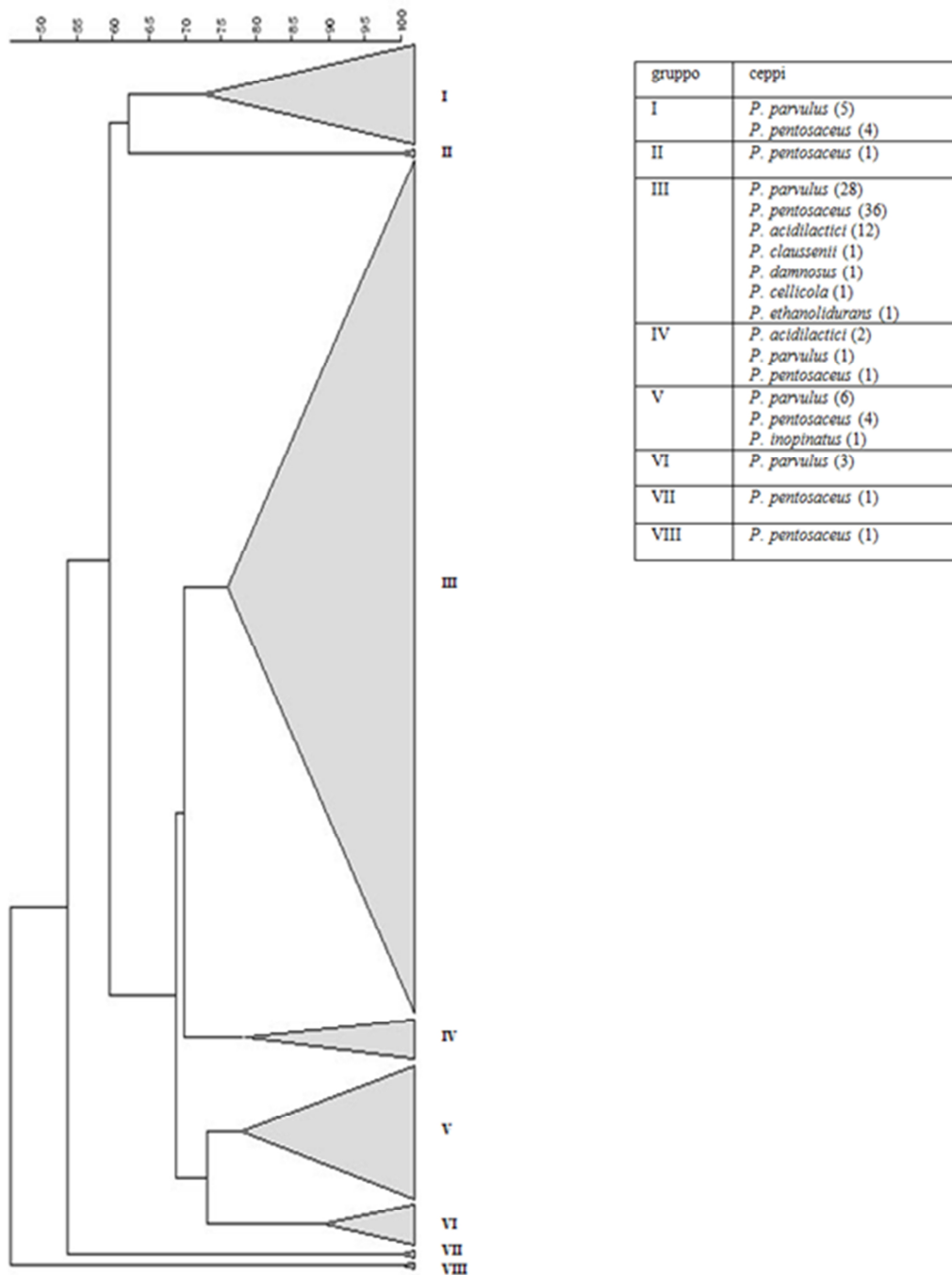


Figura 27. Dendrogramma ricavato dall'analisi dei profili ottenuti dalla tecnica Rep-PCR

L'analisi cluster dei profili ottenuti ha evidenziato un grado di similarità molto elevato tra ceppi appartenenti a specie diverse (Figura 27). A un livello di similarità del 70 % si possono distinguere 8 gruppi, di cui il gruppo II, VII e VIII erano rappresentati da ceppi di *P. pentosaceus*, il gruppo VI contenente solo 2 ceppi di *P. parvulus*, e il gruppo III contenente un numero molto elevato di ceppi appartenenti a diverse specie. E' stato osservato che i gruppi I, IV e V contenevano un limitato numero di ceppi appartenenti alle specie principali.

Dai risultati ottenuti applicando la tecnica Rep-PCR al genere *Pediococcus* si può concludere come questa sia in grado di mettere in evidenza l'elevato grado di polimorfismo tra le specie, ma non sia risultata idonea, salvo poche eccezioni, alla differenziazione dei ceppi in funzione dell'origine o della specie.

3.4.3 Caratterizzazione genetica mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

La PFGE è considerata una tecnica di riferimento quando si voglia investigare le correlazioni genetiche all'interno di un gruppo di isolati; si tratta di una tecnica riproducibile, che genera un pattern di bande di facile interpretazione e altamente discriminatoria sull'intero genoma (Tynkkynen *et al.*, 1999). Questa tecnica è stata applicata per differenziare specie appartenenti a vari generi di batteri lattici, tra cui *Lactobacillus* (Ventura e Zink, 2002), *Lactococcus* (Moschetti *et al.*, 2001) e *Pediococcus* (Simpson *et al.*, 2002).

In questa sperimentazione si è scelto di applicare questa tecnica alle due specie maggiormente rappresentate nel nostro studio, per analizzare e compararne l'intero genoma e quindi valutarne la biodiversità. I ceppi sono stati sottoposti ad analisi di restrizione con *Sma*I, *Apa*I e *Sfi*I. La restrizione enzimatica effettuata con l'enzima *Apa*I ha prodotto un numero elevato di frammenti generalmente di dimensioni inferiori a 150 kb, il che non ha permesso un'elaborazione dei gel in quanto non tutti i frammenti potevano essere distinti (Figura 28).

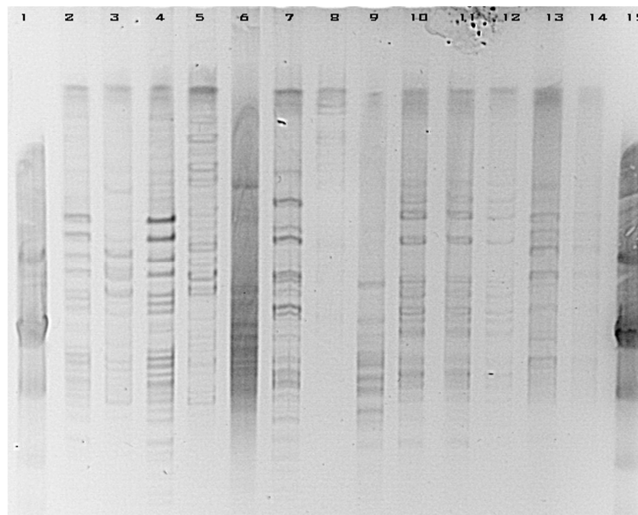


Figura 28. PFGE dopo restrizione enzimatica con *Apa*I. Lanes 1 e 15 Lambda ladder PFG marker (BioLabs, New England), lane 2 *P. pentosaceus* DSMZ 20336, lane 3 *P. pentosaceus* CECT 923, lane 4 *P. damnosus* DSMZ 20331, lane 5 *P. pentosaceus* SB 66, lane 6 *P. pentosaceus* SB 97, lane 7 *P. pentosaceus* M1, lane 8 *P. pentosaceus* BR 180, lane 9 *P. pentosaceus* PCR, lane 10 *P. pentosaceus* BFE 409, lane 11 *P. pentosaceus* BFE 412, lane 12 *P. pentosaceus* BFE 418, lane 13 *P. pentosaceus* BFE 945, lane 14 *P. pentosaceus* BFE 946.

La restrizione enzimatica con l'enzima *Sfi*I, definito *rare-cutting* poiché crea pochi frammenti ma di grandi dimensioni, ha anch'essa dato risultati poco soddisfacenti, in quanto sono stati evidenziati solo pochi frammenti di dimensioni da 400 kb a 900 kb, il che non ha consentito una differenziazione tra i ceppi.

L'utilizzo dell'enzima *Sma*I sul DNA intero dei ceppi di *Pediococcus* spp. è quello che ha prodotto i risultati migliori, in quanto i frammenti ottenuti variavano in numero da 9 a 14 (Figura 29), con pesi molecolari da 48 a 388 kb. Per la specie *P. parvulus* sono stati evidenziati 35 profili differenti su un totale di 43 ceppi, per la specie *P. pentosaceus* 37 profili su 48 ceppi. I dati da noi ottenuti per la specie *P. pentosaceus* sono in accordo con quanto descritto da Barros *et al.* (2001), che evidenziava un elevato numero di profili all'interno della specie. L'utilizzo dell'enzima *Sma*I ha in alcuni casi prodotto un certo numero di bande di peso molecolare molto basso (<10 kb), molto difficili da separare nelle condizioni di corsa elettroforetica adottate in questa sperimentazione.

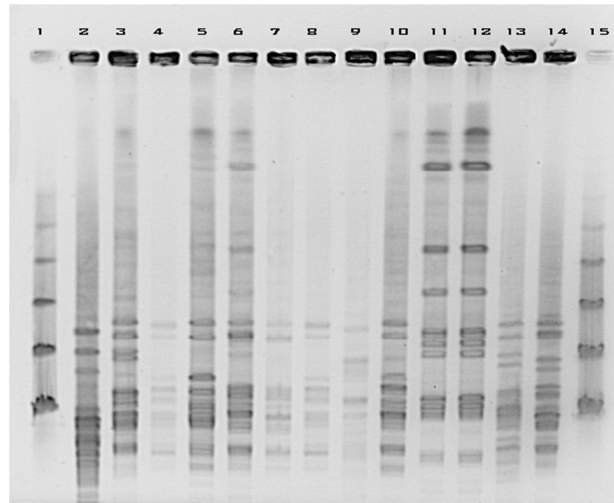


Figura 29. PFGE dopo restrizione enzimatica con *Sma*I di ceppi di *P. parvulus*. Lanes 1 e 15 Lambda ladder PFG marker (BioLabs, New England), lane 2 ceppo BR 206, lane 3 ceppo BR 207, lane 4 ceppo BR 231, lane 5 ceppo BR 250, lane 6 ceppo BR 267, lane 7 ceppo BR 269, lane 8 ceppo BR 276, lane 9 ceppo BR 282, lane 10 ceppo BR 288, lane 11 ceppo BR 296, lane 12 ceppo BR 297, lane 13 ceppo BR 301, lane 14 ceppo BR 307.

Il numero dei cluster ottenuti dall'analisi dei ceppi di *P. parvulus*, a un valore di similarità del 70% è risultato essere abbastanza elevato, indice del fatto che tra i ceppi testati, benché facenti parte della stessa specie e isolati dalla stessa tipologia di matrice alimentare, esiste un grado notevole di biodiversità e polimorfismo genetico, che l'applicazione della tecnica PFGE è stata in grado di esaltare (Figura 30).

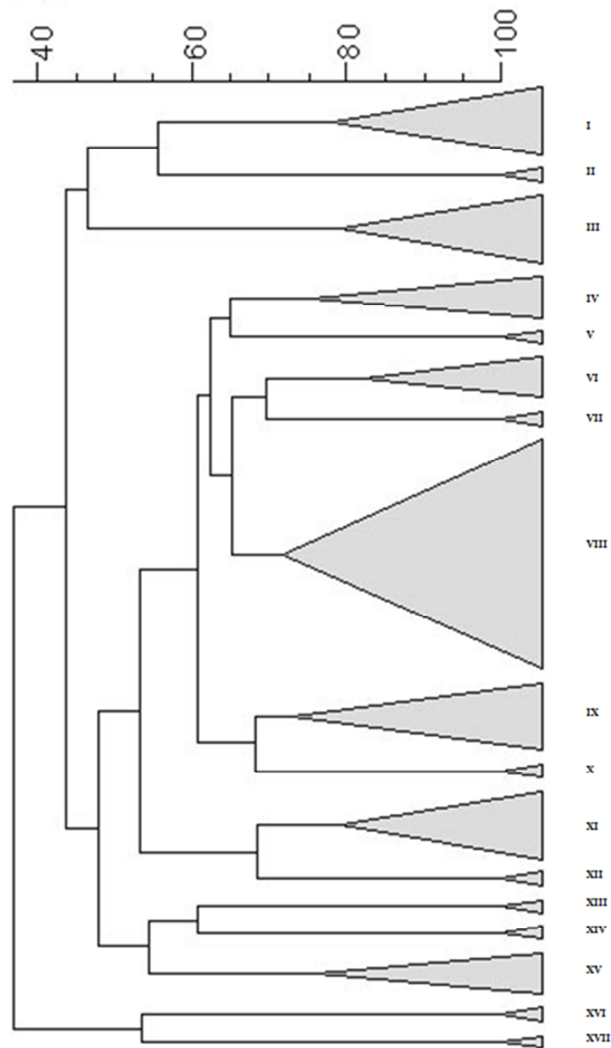


Figura 30. Dendrogramma ricavato dall'analisi dei profili PFGE di ceppi di *P. parvulus* ottenuti con restrizione enzimatica *Sma*I

L'elaborazione statistica dei profili di restrizione della specie *P. pentosaceus*, mantenendo sempre un valore di similarità al 50%, ha permesso di ottenere un cluster costituito da 9 gruppi. In alcuni casi si è osservata una correlazione tra il profilo di restrizione e la matrice alimentare di provenienza del ceppo.

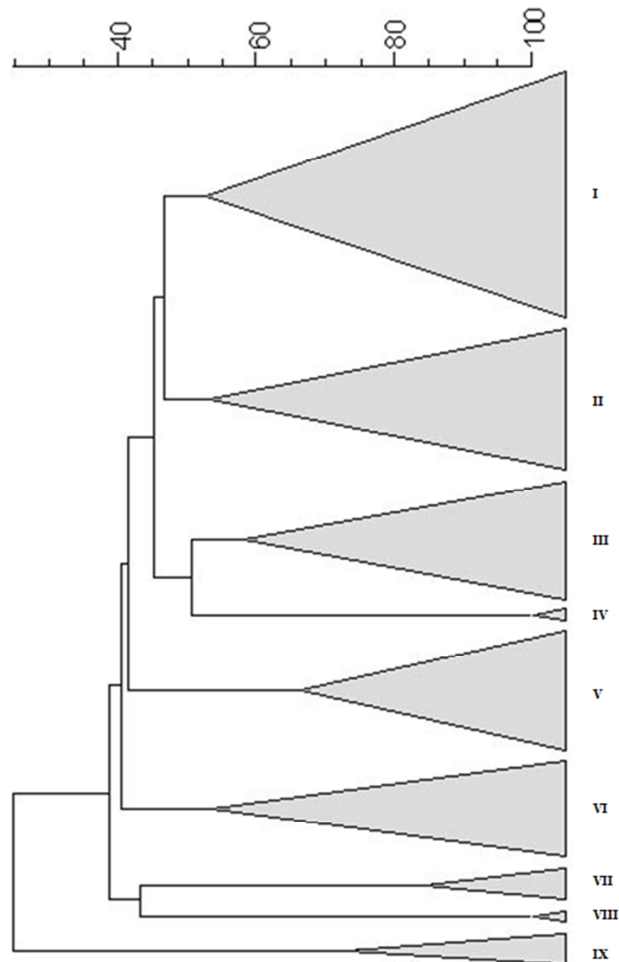


Figura 31. Dendrogramma ricavato dall'analisi dei profili PFGE di ceppi di *P. pentosaceus* ottenuti con restrizione enzimatica *Sma*I

I dati ottenuti per entrambe le specie di *Pediococcus* testate dimostrano come la tecnica PFGE sia in grado di fornire utili informazioni in merito al grado di biodiversità dei ceppi, come evidenziato anche da altri autori (Simpson *et al.*, 2002). L'alto grado di riproducibilità della PFGE la rende particolarmente adatta quando sia necessario tracciare la presenza di uno specifico ceppo in una fermentazione alimentare o in un prodotto contenente microrganismi probiotici (Simpson *et al.*, 2006).

3.5 VALUTAZIONE DI ATTRIBUTI DI SICUREZZA

I batteri lattici rivestono un ruolo di primaria importanza nel settore delle tecnologie alimentari. Essi hanno una lunga storia di utilizzo "sicuro", anche se non mancano le segnalazioni di possibili attività negative svolte da questi microrganismi negli alimenti. Un altro aspetto importante connesso all'utilizzo dei batteri lattici riguarda il ruolo svolto nel contesto degli alimenti probiotici, il cui consumo può influenzare in maniera positiva diversi processi fisiologici nell'uomo e negli animali (Fuller, 1992). Scopo di questa parte della sperimentazione è stato quello di investigare la diffusione, tra pediococchi isolati da diverse matrici, di caratteri potenzialmente correlati alla salute e alla sicurezza, quali la capacità di resistere a pH acidi e alla presenza di bile, l'antibiotico-resistenza, la capacità di produrre biofilm, l'attività aminoacido-decarbossilasica e la capacità di produrre batteriocine.

3.5.1 Resistenza all'acidità e alla bile

Nell'ambito della selezione dei microrganismi potenzialmente probiotici, uno dei prerequisiti è rappresentato dalla capacità dei microrganismi di raggiungere vivi e vitali il tratto gastrointestinale, superando le barriere chimiche legate alla elevata acidità gastrica e alla presenza di bile (Gibson *et al.*, 2000). Questi requisiti sono importanti per la sopravvivenza dei microrganismi, poiché si considera che il numero minimo di probiotici necessario ad assicurare effetti positivi sulla salute sia di circa 10^6 - 10^7 UFC/g di prodotto (Jayamanne e Adams, 2006).

La capacità di resistere all'acidità dei ceppi di *Pediococcus* è stata determinata attraverso la valutazione dei parametri Δ_{2h} a valori di pH di 3, 2,5 e 2, cioè in termini di differenza logaritmica tra la conta microbica a pH 6,2 (controllo) e la conta valutata dopo incubazione di 2 ore a pH acido. I risultati di tale analisi sono rappresentati nella Figura 32. Come si può osservare dalla figura, la maggior perdita di vitalità si osserva dopo un contatto delle cellule con un ambiente a pH 2, dove la differenza logaritmica non era mai inferiore a 5. Dopo un contatto di due ore a pH 2,5 il comportamento del genere *Pediococcus* cambia notevolmente, in quanto i dati sono dispersi in un intervallo molto ampio e vengono individuati alcuni ceppi che dimostrano una certa tolleranza all'acidità. Due ceppi, un *P. parvulus* e un *P. acidilactici*, isolati entrambi da vegetali fermentati, avevano valori di Δ_{2h} compresi tra 1 e 2. Per comprendere il significato di tali valori, bisogna considerare che in un prodotto probiotico la conta microbica è compresa tra 10^6 e 10^7 UFC/g o /mL; se si calcola un consumo medio di ca. 100 g o mL per porzione, una sopravvivenza dell'1% delle cellule assicurerebbe comunque un'assunzione di 10^6 - 10^7 cellule vive, il che può comportare un effetto fisiologico (Immerstrand *et al.*, 2010).

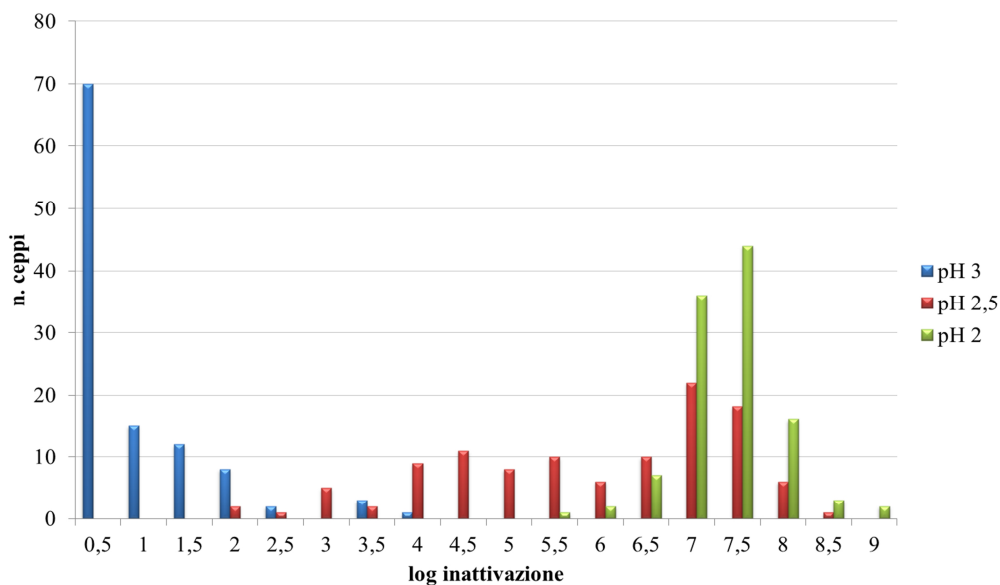


Figura 32. Istogramma relativo alla tolleranza dei ceppi di *Pediococcus* spp. a diversi valori di pH acido

A pH 3 i valori di Δ_{2h} più elevati erano riferiti a un numero limitato di ceppi, segno che i pediococchi hanno un buon grado di sopravvivenza a questo valore di pH (Yuksekdag *et al.*, 2004). Sapendo che il pH dello stomaco ha un range di valori compreso tra 1,5 e 6, normalmente tra 2,5 e 3, e che il tempo che gli alimenti impiegano per transitare attraverso lo stomaco è di 90 minuti circa, questi risultati indicano una buona tolleranza dei pediococchi alle condizioni ambientali presenti nello stomaco (Immerstrand *et al.*, 2010).

Gli isolati sono stati valutati anche per la capacità di crescere in presenza di sali biliari, in particolare dello 0,15%, 0,3% e 0,5% di oxgall (bile disidratata), attraverso un saggio turbidimetrico in cui veniva misurata ogni ora per 48 ore la crescita in presenza e in assenza di oxgall. I risultati sono stati espressi in termini di grado di inibizione (%_{oxgall}) della crescita dovuto alla presenza di bile. In Figura 33 sono riportati i dati di questa parte della sperimentazione. Nella rappresentazione grafica i valori prossimi allo 0 in ascissa indicano assenza di inibizione da bile, mentre valori elevati indicano una importante perdita di vitalità.

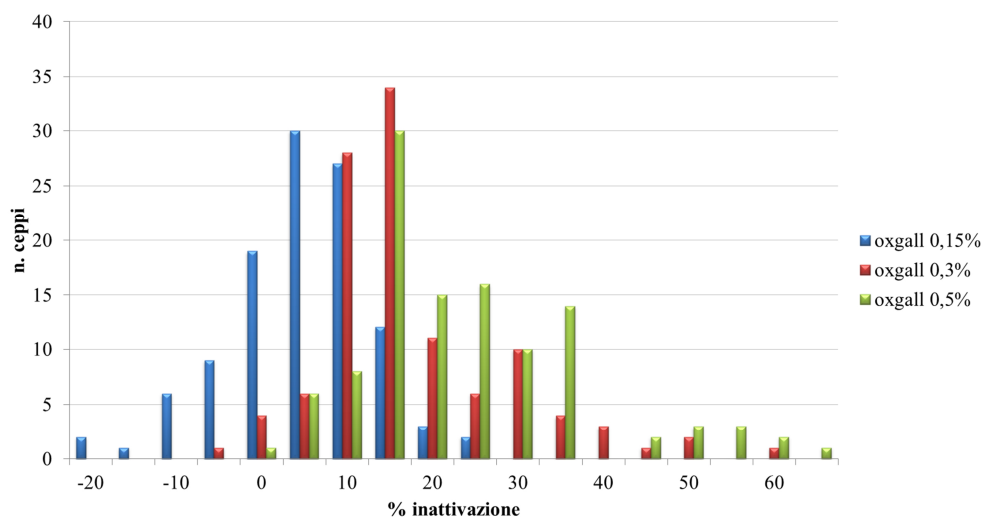


Figura 33. Istogramma relativo alla tolleranza dei ceppi di *Pediococcus* spp. a diverse concentrazioni di oxgall (bile disidratata)

L'esposizione alla bile rappresenta un passaggio critico durante il transito gastro-intestinale, e solitamente la concentrazione di bile presente nell'intestino è dello 0,3% (Immerstrand *et al.*, 2010), anche se la concentrazione può variare in funzione della dieta. In base a questa premessa, i valori ottenuti sui pediococchi hanno mostrato una buona tolleranza ai sali biliari, considerando che la maggior parte dei ceppi presentava un grado di inibizione attorno al 15%. Il tasso di inibizione medio aumentava di poco in presenza di concentrazioni di bile pari allo 0,5%.

Il dato più interessante riguarda un piccolo gruppo di ceppi, di cui 4 *P. parvulus* e 1 *P. pentosaceus*, la cui crescita era stimolata dalla presenza dello 0,3% di oxgall. L'effetto di stimolazione era ancora più

evidente in ceppi cresciuti in presenza di oxgall allo 0,15%. In Figura 34 sono riportati i comportamenti di ceppi inibiti o stimolati dalla presenza di bile.

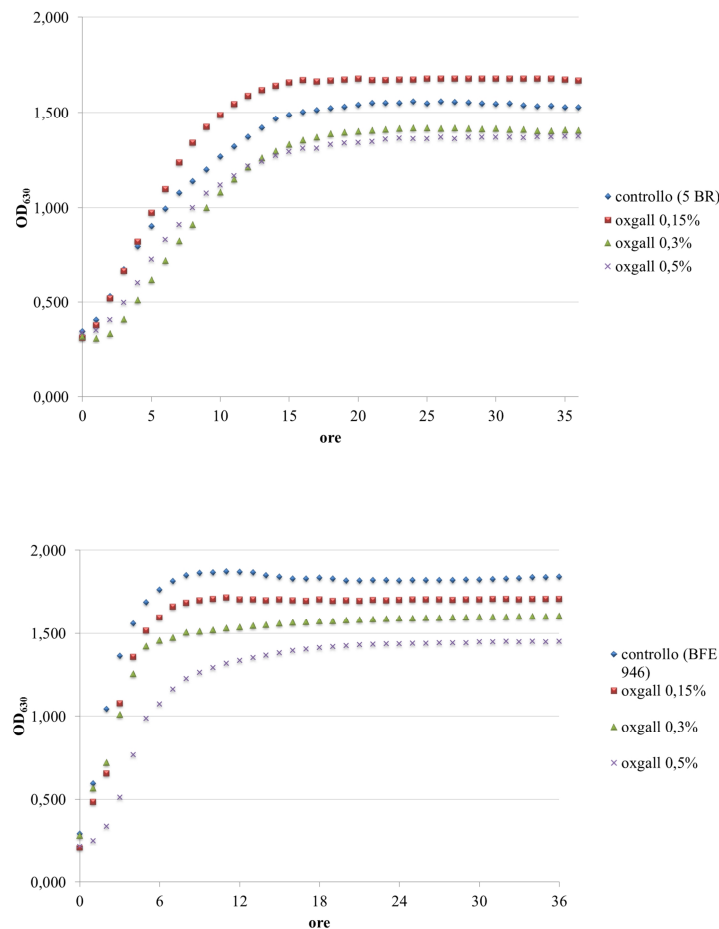


Figura 34. Curve di crescita di diversi ceppi inibiti o stimolati dalla presenza di oxgall

I risultati ottenuti in questa fase assumono risvolti interessanti in quanto in letteratura è disponibile un numero molto limitato di dati, soprattutto limitatamente alla specie *P. parvulus*.

3.5.2 Resistenza agli antibiotici

Un importante criterio di sicurezza d'uso che è stato valutato in questa sperimentazione è la resistenza agli antibiotici. La resistenza agli antibiotici può essere un carattere intrinseco, cioè presente naturalmente nel genoma ed ereditabile solo dalle cellule figlie, oppure presente su elementi extra-cromosomali (plasmidi) e come tale trasferibile sia alle cellule figlie che a specie diverse (Normark e Normark, 2002). Sebbene la maggior parte dei batteri lattici di origine alimentare abbia la qualifica QPS (Qualified Presumption of Safety), e nel caso dei pediococchi le specie considerate sicure sono *P. pentosaceus* e *P. acidilactici*, l'utilizzo delle colture ai fini alimentari non deve prescindere dall'assenza di caratteri di antibiotico-resistenza, come sottolineato in maniera chiara molto recentemente da Leuschner *et al.* (2010). E' stato dimostrato che enterococchi, lattococchi, leuconostoc, pediococchi e meno frequente-

mente i lattobacilli possono possedere fino a 16 plasmidi che possono veicolare geni di resistenza (Mathur e Singh, 2005).

In linea generale i pediococchi sono da considerarsi non patogeni, solo in rari casi possono comportarsi da patogeni opportunisti (Barros *et al.*, 2001). Per questa ragione non sono stati pubblicati dati relativi ai valori di *breakpoint*, che costituiscono la base di partenza per la valutazione del carattere di antibiotico-resistenza (NCCLS, 1997). Tali standard solitamente vengono calcolati per specie patogene, tuttavia l'utilizzo degli stessi valori per altre specie non appare corretto, nonostante alcuni autori usino questo approccio (Kastner *et al.*, 2006). Infatti anche l'utilizzo, per i batteri lattici, di criteri messi a punto per gruppi microbici affini, per esempio appartenenti al genere *Streptococcus*, può dare origine a un errore di valutazione fino al 20% dei casi (Swenson *et al.*, 1990). Per queste motivazioni si è scelto di riportare i dati relativi al diametro dell'alone di inibizione valutato attraverso il *disk diffusion test* in termini assoluti, senza utilizzare una scala di valutazione finalizzata alla definizione di ceppi sensibili, mediamente sensibili e resistenti. L'unica categorizzazione dei ceppi è stata fatta nei casi in cui l'alone di inibizione era completamente assente: in questi casi i ceppi sono stati considerati resistenti. In Figura 35 è riportata la distribuzione dei dati rappresentati attraverso dei box-plot.

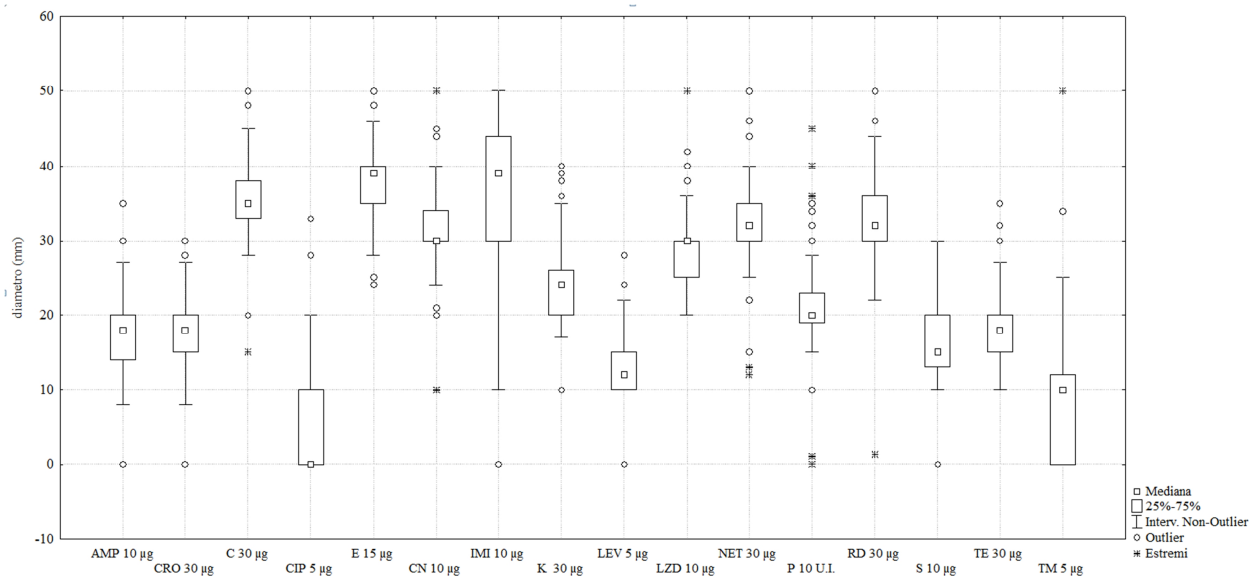


Figura 35. Box plot riferito al comportamento dei ceppi nei confronti di diversi antibiotici

Nel caso degli antibiotici vancomicina, teicoplanina e meticillina, per tutti i ceppi non è stato osservato alone di inibizione, per cui i ceppi vanno considerati resistenti. Per quanto riguarda la vancomicina e la teicoplanina, i pediococchi hanno una resistenza intrinseca, come evidenziato da Tankovic *et al.*, (1993). Per tutti gli altri antibiotici, il comportamento era legato al ceppo. All'interno della collezione, 90 ceppi su 111 hanno mostrato almeno una resistenza fenotipica, e ben 36 ceppi erano da considerarsi multi-resistenti, cioè erano resistenti ad antibiotici appartenenti a diverse categorie. Questa caratteristica va

considerata con criticità, in quanto la selezione dei ceppi da utilizzare negli alimenti richiede l'assenza di questo attributo secondo l'approccio QPS proposto dall'EFSA (Leuschner *et al.*, 2010).

Per alcuni antibiotici, come la ciprofloxacina e il trimethoprim, la media dei diametri era molto bassa, il che potrebbe far presupporre una discreta resistenza. Nel caso invece degli antibiotici cloramfenicolo, eritromicina, netilmicina e rifampicina i dati si collocavano su livelli elevati di diametro, indice di una probabile sensibilità dei pediococchi. Un altro dato da rilevare riguarda l'antibiotico imipenem, nel cui caso i dati sono risultati dispersi in un intervallo di diametri molto ampio.

Nel complesso questi dati possono costituire una base di partenza per la definizione di criteri (*breakpoint*) utili alla classificazione dei ceppi di pediococchi in termini di resistenza a specifici antibiotici.

3.5.3 Formazione di biofilm

La capacità di formazione di *biofilm* è una caratteristica che ha duplice ruolo: da una parte indica la capacità di colonizzare le superfici e potenzialmente di resistere ai protocolli routinari di sanificazione, dall'altra invece può rivestire un ruolo interessante in quanto può essere correlata alla capacità di aderire alle mucose e colonizzare, almeno transitoriamente, l'habitat intestinale (Ortu *et al.*, 2007). I ceppi sono stati studiati attraverso un test in micropiastra, che è considerato comunemente un metodo di *screening* che permette la quantificazione della biomassa che aderisce alle superfici (Stepanović *et al.*, 2007). I ceppi sono stati classificati secondo i criteri di Christensen *et al.* (1985), che tengono conto della densità ottica dei pozzetti inoculati rispetto ai pozzetti controllo non inoculati, e in Figura 36 sono riportati i dati ottenuti.

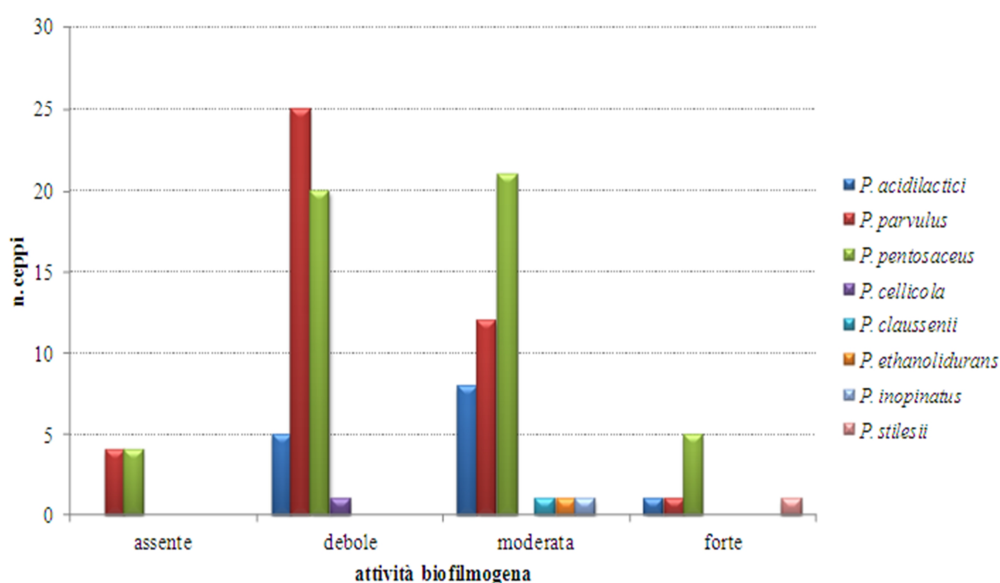


Figura 36. Attività biofilmogena di *Pediococcus* spp.

La maggior parte ha dimostrato una capacità biofilmogena da debole a moderata, e solo 8 ceppi, prevalentemente appartenenti alla specie *P. pentosaceus*, erano classificati come forti produttori. Al di là del settore caseario, per il quale sono disponibili alcuni dati relativi alla capacità biofilmogena dei batteri lattici (Ortu *et al.*, 2007), per quanto riguarda i ceppi isolati da altre matrici non sono stati effettuati studi.

I ceppi isolati sono stati testati per la produzione di batteriocine contro diversi microrganismi indicatori, sia patogeni che alteranti. Nessun isolato ha dimostrato la capacità di produrre queste sostanze antimicrobiche, nonostante in letteratura questa attività è stata ampiamente riconosciuta tra i ceppi di pediococchi. Va peraltro detto che la frequenza di ritrovamento di ceppi produttori è piuttosto limitata, come sottolineato da molti autori (Ross *et al.*, 2002).

I risultati relativi al test di decarbossilazione degli aminoacidi istidina, tirosina, lisina e ornitina rivelano che nessun ceppo era un potenziale produttore di ammine. All'interno del genere *Pediococcus* alcuni ceppi sono in grado di produrre tiramina durante la produzione di birra (Izquierdo-Pulido *et al.*, 1997). In linea generale si può dire che l'attività amminoacido-decarbossilasica dei batteri lattici, e in particolare quella del genere *Pediococcus*, è meno intensa rispetto a quella di altri gruppi microbici (es. coliformi), tuttavia in considerazione delle cariche elevate che questi raggiungono nel corso delle fermentazioni dei prodotti di origine vegetale e animale, il loro ruolo di potenziali produttori di ammine non va affatto sottovalutato (Stratton *et al.*, 1992).

4 CONCLUSIONI

I microrganismi appartenenti al genere *Pediococcus* fanno parte di un vasto gruppo microbico, quello dei batteri lattici, che riveste un ruolo di primaria importanza nel settore degli alimenti fermentati e degli alimenti contenenti probiotici. Grazie agli aspetti tecnologicamente interessanti dei batteri lattici, esiste una vasta letteratura che esplora biodiversità, fisiologia e aspetti funzionali di questi microrganismi. I pediococchi, tuttavia, hanno attirato poco l'attenzione dei ricercatori in quanto, pur essendo presenti nei prodotti fermentati sia di origine animale che vegetale, vengono spesso mascherati da microflora lattiche presenti in concentrazioni superiori (es. nei prodotti caseari) oppure hanno un ruolo riconosciuto nei prodotti vegetali fermentati con fermentazioni naturali, dove per tradizione accompagnano i lattobacilli nei processi di acidificazione. Tuttavia i pochi dati disponibili indicano chiaramente la possibilità che alcuni ceppi appartenenti alle specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* possano essere utilizzati ad esempio come probiotici negli alimenti destinati all'alimentazione zootecnica oppure come starter per fermentazioni di carni e insalati. Per quanto riguarda la specie *P. parvulus*, prevalente in alcune nicchie specifiche, i dati disponibili in bibliografia sono assolutamente insufficienti a definirne in maniera chiara le caratteristiche biochimiche, tecnologiche, funzionali e genotipiche. Lo scopo di questa sperimentazione è stato quindi quello di esplorare alcuni aspetti specifici legati ai pediococchi presenti negli alimenti, al fine di aprire nuovi spiragli all'utilizzo industriale dei ceppi appartenenti a questo gruppo microbico.

Le evidenze scientifiche ottenute in questa sperimentazione dimostrano in maniera chiara che, mentre le specie *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* hanno un habitat piuttosto eterogeneo, essendo state isolate da alimenti di origine vegetale, animale, da campioni clinici e dall'ambiente, la specie *P. parvulus* ha una nicchia ecologica specifica, che è quella dei vegetali fermentati. L'adattamento di questa specie al substrato specifico rende i ceppi particolarmente adattati alla crescita e all'acidificazione a temperature attorno ai 20 °C e alla capacità di fronteggiare in maniera positiva gli stress di natura acida. La spiccata attività acidificante del genere *Pediococcus*, che in alcuni casi porta il pH finale del substrato a valori inferiori a 4, spiega la prevalenza di questo genere negli alimenti fermentati, dove spesso questi microrganismi portano avanti i processi di acidificazione correlati alla seconda fase della fermentazione (nel caso dei vegetali) o della maturazione (nel caso dei prodotti caseari). Un ruolo nei processi proteolitici dei prodotti fermentati va in linea di massima escluso, in quanto questa attività non è stata evidenziata in alcuno dei ceppi isolati da diverse matrici alimentari.

Una parte di questa sperimentazione ha riguardato l'esplorazione di caratteristiche correlate a una possibile attività funzionale dei ceppi, in funzione di un eventuale utilizzo come microrganismi probiotici. I ceppi testati hanno dimostrato dei tratti fisiologici interessanti, legati sia alla capacità di tollerare bene, entro specifici intervalli di pH, lo stress acido che la presenza di sali biliari, che rappresentano il primo grosso ostacolo di natura chimico-biologica che i microrganismi probiotici incontrano durante il transito gastro-intestinale. Relativamente alla bile, alcuni isolati hanno dimostrato la capacità di essere stimolati,

limitatamente alle attività connesse alla crescita, da basse concentrazioni, il che potrebbe far pensare all'instaurarsi di meccanismi di *stress-response* potenzialmente interessanti da un punto di vista biologico e tecnologico. Questo carattere, unitamente alla mancanza della capacità di decarbossilare gli aminoacidi, rende i ceppi particolarmente interessanti da un punto di vista tecnologico, anche se tra una parte gli isolati è stata evidenziata una potenziale criticità correlata alla presenza del carattere di multiresistenza ad alcuni antibiotici, che potrebbe rappresentare un ostacolo all'ottenimento dello status QPS per alcuni isolati.

Da un punto di vista genotipico, l'applicazione di più tecniche di biologia molecolare ha dimostrato una elevata eterogeneità all'interno del gruppo dei *Pediococchi*, che in alcuni casi potrebbe rappresentare un ostacolo all'assegnazione dei ceppi alle diverse specie. La tecnica che si è dimostrata in grado di discriminare meglio le diverse specie è risultata la ISR-PCR, mentre la PFGE continua ad essere la scelta più indicata per l'evidenziazione della biodiversità genotipica intra-specie, e che può essere sfruttata con buoni risultati per tracciare la presenza di uno specifico ceppo in una fermentazione alimentare o in un prodotto contenente microrganismi probiotici.

In conclusione, i dati ottenuti in questo studio possono essere considerati un buon punto di partenza per approfondire gli aspetti scientifici correlati alla presenza di *Pediococcus* spp. negli alimenti, anche al fine di un potenziale utilizzo tecnologico.

5 BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.S. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 68, 171-178.
- Albano, E., Todorov, S.D., van Reenen, C.A., Hogg, T., Dicks, L.M.T., Teixeira, P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 239-247.
- Amor, B.K., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.* 137, 741-747.
- Arriola, K.G., Kim, S.C., Adesogan, A.T. 2011. Effect of applying inoculants with heterolactic or homo-lactic and heterolactic bacteria on the fermentation and quality of corn silage. *J. Dairy Sci.* 94, 1511-1516.
- Balcke, J. 1884. Ueber häufig vorkommende Fehler in der Bierbereitung. *Wschr. f. Brauerei* 1, 181-184.
- Barros, R., Da Glória, M., Carvahlo, S., Peralta, J.M., Falcklam, R., Teixeira, L. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Pediococcus* strains isolated from human clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1241-1246.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Perez- Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., Còrdoba, M.G. 2007. Characterization and selection of autochthons lactic acid bacteria isolated from traditional iberian dry-fermented and chorizo sausages. *J. Food Sci.* 72, 193-201.
- Bhowmik, T., Marth, E.H. 1990a. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. *J. Dairy Sci.* 73, 859-866.
- Bhowmik, T.R., Marth E.H. 1990b. Peptide-hydrolysing enzymes of *Pediococcus* species. *Microbios* 62, 197-211.
- Bhowmik, T.R., Riesterer, M.A., Van Boekel, J.S., Marth, E.H. 1990. Characteristics of low-fat cheddar cheese made with added *Micrococcus* or *Pediococcus* species. *Milchwissenschaft* 45, 230-235.
- Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1265-1267.
- Blaiotta, G., Pennacchia, C., Ercolini, D., Moschetti, G., Villani, F. 2003. Combining Denaturing gel electrophoresis of 26S rDNA and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analysis for the identification of staphylococci from Italian sausage. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 423-433.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Schure, E.T., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., Hansen, E.B. 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87-97.
- Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, R. 1998. Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. *J. Appl. Microbiol.* 85, 123-131.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33-41.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 185-189.
- Brassart, D., Schriffirin, E. 1997. The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Tech.* 8, 321-326.
- Brink, B.T., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., Huis in't Velt, J.H.J. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in food. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 73-84.
- Buffa, M., Morais, A., Jiménez-Belenguer, A., Hernandez-Giménez, E., Guamis, B. 2005. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from raw ewes' milk for cheese making. *Milchwiss.* 61, 404-407.
- Bunčić, S., Paunović, Lj., Teodorović, V., Radišić, D., Vojinović, G., Smiljanić, D., Baltić, M. 1993. Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 303-309.

- Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno, Y., Nakase, T. 1999. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2901-2906.
- Caldwell, S.L., McMahon, D.J., Oberg, C.J., Broadbent, J.R. 1996. Development and characterization of lactose-positive *Pediococcus* species for milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 936-941.
- Callon, C., Millet, C., Montel, M.C. 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* 71, 231-244.
- Calmin, G., Lefort, F., Belbahri, L. 2008. Multi-locus sequence typing (MLST) for two of lactic acid bacteria (LAB) species: *P. parvulus* and *P. damnosus*. *Mol. Biotechnol.* 40, 170-179.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131-149.
- Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M.E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M., Cardazzo, B. 2011. Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. *Res. Microbiol.* 162, 231-239.
- Cataloluk, O., Gogebaken, B. 2004. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 7-12.
- Champagne, C.P., Lacroix, C., Sodini-Gallot, I. 1994. Immobilized cell technologies for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 109-134.
- Chowdhury, B.R., Chakraborty, R., Chaudhuri, U.R. 2007. Validity of modified Gompertz and logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. *J. Food. Eng.* 80, 1171-1175.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996-1006.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H., Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219-1227.
- Cintas, L.M., Rodriguez, J.M., Fernandez, M.F., Sletten, K., Nes, I.F., Hernandez, P.E., Holo, H. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2643-2648.
- Claisse, O., Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of *rpoB* gene. *J. Microbiol. Meth.* 69, 387-390.
- Cocconcelli, P.S., Cattivelli, D., Gazzola, S. 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 315-323.
- Coderre, P.E., Somkuti, G.A. 1999. Cloning and expression of pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.* 39, 295-301.
- Collins, M., Williams, A.M., Wallbanks, S. 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 5-12.
- Comelli, E.M., Guggenheim, B., Stinglele, F., Neeser, J.-R. 2002. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur. J. Oral Sci.* 110, 218-224.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Grazia, L. 1997. Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* 64, 305-310.
- Costerton, J.W. 2005. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin. Orthop. Relat. R.* 437, 7-11.

- Cronin, T., Ziino, M., Condruso, C., McSweeney, P.L.H., Mills, S., Ross, R.P., Stanton, C. 2007. A survey of the microbial and chemical composition of seven semi-ripened Provola dei Nebrodi Sicilian cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1128-1139.
- Danielsen, M., Simpson, P.J., O'Connor, E.B., Ross, R.P., Stanton, C. 2006. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol.* 102, 384-389.
- Davidson, B.E., Kordias, N., Dobos, M., Hillier, A. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Anton van Leeuw.* 70, 161-183.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *Am. J. Enol. Viticult.* 39, 137-142.
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Lee, T.H., Fleet, G.H. 1986. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 539-545.
- De Brabandere, A.G., De Baerdemaeker, J.G. 1999. Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *J. Food Eng.* 41, 221-227.
- Delfini, C. 1989. Ability of wine malolactic bacteria to produce histamine. *Sci. Aliment.* 9, 413-416.
- Dobson, C.M., Deneer, H., Lee, S., Hemmingsen, S., Glaze, S., Ziola, B. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 52, 2003-2010.
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., Cocolin, L. 2008. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 25, 392-399.
- Dolezil, L., Kirsop, B.H. 1977. The use of *Lactobacillus* System for the characterization of *Pediococci*. *J. Appl. Bact.* 42, 213-217.
- Dossmann, M.U., Vogel, R.F., Hammes, W.P. 1996. Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 334-339.
- Drake, M.A., Karagül-Yüceer, Y., Chen, X.Q., Cadwallader, K.R. 1999. Characterization of desirable and undesirable lactobacilli from cheese in fermented milk. *Lebensm. Wiss. Technol.* 32, 433-439.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70, 564-582.
- Edema, M.J., Sanni, A. I. 2008. Functional properties of selected starter cultures four sour maize bread. *Food Microbiol.* 25, 616-625.
- Edward, S.T., Sandine, W.E. 1981. Public health significance of amines in cheese. *J. Dairy Sci.* 64, 2431-2438.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London ON, Canada.
- Felis, G.E., Torriani, S., Dellaglio, F. 2005. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi* (ex Mees 1934) Garvie 1988, as *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55, 1325-1327.
- Fleet, G.H. 2003. Yeast interaction and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11-22.
- Font de Valdez, G., de Giori, G.S., Garro, M., Mozzi, F., Oliver, G. 1990. Lactic acid bacteria from naturally fermented vegetables. *Microbiol. Alim. Nutrit.* 8, 175-179.
- Fortina, M.G., Nicasastro, G., Carminati, D., Neviani, E., Manachini, P.L. 1998. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 84, 72-80.
- Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385-4389.

- Franz, C.M.A.P., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., De Wachter, M., Cleenwerck, I., Schillinger, U., Holzappel, W.H, Swings, J. 2006. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. Int. J. Syst. Evol. Micr. 56, 329-333.
- Franz, C.M.A.P., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., De Wachter, M., Cleenwerck, I., Schillinger, U., Holzappel, W.H, Swings J. 2006. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. Int. J. Syst. Evol. Micr. 56, 329-333.
- Fuller, R. 1992. Probiotics: the scientific basis. Chapman and Hall, London, UK.
- García-Martínez, J., Acinas, S.G., Antón, A.I., Rodríguez-Valera, F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studied of prokaryotic diversity. J. Microbiol. Meth. 36, 55-64.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E., Suzzi, G. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. Int. J. Food Microbiol. 64, 105-117.
- Gardner, N.J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C.P. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. Int. J. Food Microbiol. 64, 261-275.
- Garvie, E.I. Genus *Pediococcus* Claussen 1903. 1986. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 2, 1075-1079.
- Gassem, M.A. 1999. Study of the microorganism associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. J. Appl. Microbiol. 86, 221-225.
- Gevers, D., Huys, G., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., Debevere, J., Swings, J. 2000. Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. Syst. Appl. Microbiol. 23, 279-284.
- Gibson, G.R., Otaway, P.B., Robert, A.R. 2000. Probiotics: new developments in functional foods. Chandos Publishing (Oxford) Limited, London, UK.
- Giraffa, G., Andrighetto, C., Antonello, C., Gatti, M., Lazzi, C., Marcazzan, G., Lombardi, A., Neviani, E. 2004. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. Int. J. Food Microbiol. 91, 129-139.
- Graham, D.C., Mc Cay, L.L. 1985. Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. Appl. Environ. Microbiol. 50, 532-534.
- Gunduz, G.T., Tunnel, G. 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. Anton van Leeuw. 89, 329-336.
- Haakansen, M., Dobson, C., Hill, J., Ziola, B. 2009. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) Back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. Int. J. Syst. Evol. Micr. 59, 615-621.
- Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., Holzappel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganism in food. Trends Food Sci. Tech. 5, 42-48.
- Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiol. Rev. 87, 165-173.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. 1989. Anti-microbial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52, 384-387.
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B., Suarez, J.E. 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. J. Appl. Microbiol. 81, 565-570.
- Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., Mattick, A.T.R. 1951. A note on the inhibition of an anaerobic spore former in Swiss-type cheese by a nisin producing *Streptococcus*. J. Dairy Res. 18, 205-210.
- Hollerová, I., Kubizniaková, P. 2001. Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. J. Inst. Brew. 107, 355-358.

- Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W., Back, W., Dicks, L.N.T. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. 2006. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stakebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer, New York, Vol. 4, 3rd Edition, 229-266.
- Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W., Dicks, L.M.T. Genus III. *Pediococcus* Claussen 1903. 2009. In: Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer, New York, Vol. 3, 2nd Edition, 513-521.
- Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W., Dicks, L.M.T. Genus III, *Pediococcus* Claussen 1903. 2009. In: Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, Vol. 3, 2nd Edition, 513-521.
- Hughes, V.M., Datta, N. 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era. *Nature*.302, 725-726.
- Immerstrand, T., Paul, J. C., Rosenquist, A., Deraz, S., Mårtesson, O.B., Ljungh, A., Blücher, A., Öste, R., Holst, O., Karlsson, E.N. 2010. Characterization of the properties of *Pediococcus parvulus* for probiotic or protective culture use. *J. Food Prot.* 73, 960-966.
- Izquierdo-Pulido, M., Carceller-Rosa, J.M., Marine-Font, A., Vidal-Carou, M.C. 1997. Tyramine formation by *Pediococcus* spp. during beer fermentation. *J. Food Prot.* 60, 831-836.
- Jayamanne, V.S., Adams, M.R. 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 189-194.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 945-952.
- Jones, R.J. 2004. Observation on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum packaged beef. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 273-282.
- Jonganurakkun, B., Wang, Q., Hua Xu, S., Tada, Y., Minamida, K., Yasokawa, D., Sugi, M., Hara, H., Asano, K. 2008. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *J. Biosci. Bioeng.* 106, 69-73.
- Joosten, H.M.L.J., Northolth, M.D. 1987. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. Decarboxylative properties of some non-starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 259-280.
- Juillard, V., Spinner, H.E., Desmazeaud, M.J., Boquien, C.Y. 1987. Phenomenes de co-operation et d'inhibition entre les bacteries lactiques utilises en industrie laitiere. *Le Lait* 67, 149-172.
- Juncioni de Arauz, L., Jozala Faustino, A., Mazzola Gava, P., Vessoni Penna, T. C. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 146-154.
- Kandler, O., Weiss, N. Regular, non-sporing Gram-positive rods. 1986. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 2, 1208-1234.
- 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 145-155.
- Khan, T.M., May, B., Smooker, P.M, Van Thi, T.H., Coloe, P.J. 2010. Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. *Food Res. Int.* 44, 338-344.
- Kneifel, W., Kaufmann, M., Fleischer, A., Ulberth, F. 1992. Screening of commercially available mesophilic dairy starter cultures: biochemical, sensory, and microbiological properties. *J. Dairy Sci.* 75, 3158-3166.
- Knorr, D. 1998. Technological aspects related to microorganism in functional foods. *Trend. Food Sci. Tech.* 9, 295-306.
- Komprda, T., Sladková, P., Dohnal, V. 2009. Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Sci.* 83, 534-542.

- Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 9-27.
- Kunene, N.F., Geornaras, I., von Holy, A., Hastings, J.W. 2000. Characterization and determination of origin of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented weaning food by analysis of soluble protein and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1084-1092.
- Lasagno, M., Beoleito, V., Sesma, F., Raya, R., Font, D., Eraso, A. 2002. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *New Microbiol.* 25, 37-44.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Vélez, M.P., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6768-6775.
- Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 270-285.
- Leuschner, R.G.K., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Forget, F.R., Klein, G., Licht, T.R., Nguyen-The, C., Querol, A., Richardson, M., Suarez, J.E., Thrane, U., Vlak, J.M., von Wright, A. 2010. Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends Food Sci. Technol.* 21, 425-435.
- Li, Y., Raftis, E., Canchaya, C., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D., O'Toole, P. 2006. Polyphasic analysis indicates that *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* and *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinii* do not merit separate subspecies status. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2397-2403
- Litopolulou-Tzanetaki, E., Graham, D.C., Beyatli, Y. 1989. Detection of pediococci and other non-starter organism in American Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 72, 854-858.
- Liu, L., Zhang, B., Tong, H., Dong, X. 2006. *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov. isolated from the walls of a distilled-spirit- fermenting cellar. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56, 2405-2408.
- Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Micr. Lett.* 199, 9-13.
- Lonzano, J.C.N., Meyer, J.N., Sletten, K., Pelaz, C., Ness, I.F. 1992. Purification and amino-acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1985-1990.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Hagny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53, 742-746.
- Maifreni, M., Marino, M., Conte, L. 2004. Lactic acid fermentation of *Brassica rapa*: chemical and microbial evaluation of a typical Italian product (*brovada*). *Eur. Food Res. Technol.* 218, 469-473.
- Manca de Nadra, M., Strasser de Saad, A. 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 27, 101-106.
- Marino, M., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Rondinini, G. 2008. Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *J. Appl. Microbiol.* 105, 540-549.
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., Rondinini, G. 2000. The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 169-173.
- Martin, N.H., Murphy, S.C., Ralyea, R.D., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2011. When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *J. Dairy Sci.* 94, 3176-3183.
- Mathur, S., Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281-95.
- Mathys, S., von Ah, U., Lacroix, C., Staub, E., Mini, R., Cereghetti, T., Meile, L. 2007. Detection of the pediocin gene *pedA* in strains of human faeces by real-time PCR and characterization of *Pediococcus acidilactici* UVA1. *Biotechnol.* 7, 55-58.

- Mora, D., Fortina, M.G., Parini, C., Daffonchio, D., Manachini, P.L. 2000. Genomic subpopulations within the species *P. acidilactici* detected by multi locus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non producing strains. *Microbiology* 146, 2027-2038.
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S. 2001. Nisin-producing organisms during traditional "Fior di latte" cheese-making monitored by multiplex-PCR and PFGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 109-116.
- Mugula, J.K., Nnko, A.S., Narvhus, J.A., Sorhaug, T. 2003c. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 187-199.
- NCCLS, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard. NCCLS document M7-A4. National Committee on Clinical Laboratory Standards, Wayne, PE, 1997.
- NCCLS, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. NCCLS document M2-A8. National Committee on Clinical Laboratory Standards, Wayne, PE, 2003.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Povera, J.M., Palop, L.I., Cabezas, L. 2009. Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in processing of artisanal Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1505-1517.
- Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., del C. Peláez-Martínez, M., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Gutiérrez-Fernández, Á.J., Hardisson de la Torre, A. 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control.* 21, 679-685.
- Nigatu, A., Ahrné, S., Gashe, B.A., Molin, G. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolated. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 412-416.
- Normark, B.H., Normark, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Int. Med.* 252, 91-106.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691-3701.
- Oh, S., Kim, S.H., Worobo, R.W. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.* 83, 2747-2752.
- Olson, N.F. 1990. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavour. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 131-147.
- Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. Host and Son, Copenhagen.
- Ortu, S., Felis, G.E., Marzotto, M., Deriu, A., Molicotti, P., Sechi, L.A., Dellaglio, F., Zanetti, S. 2007. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu a traditional Sardinian fermented milk. *Int. Dairy J.* 17, 1312-1320.
- Osborne, J.P., Mira de Orduna, R., Pilone, G.J., Liu, S.Q. 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 191, 51-55.
- Papagianni, M., Anastasiadou, S. 2009. Pediocins: the bacteriocins of *Pediococcus*. Sources, production, properties and applications. *Microb. Cell Fact.* 8-23.
- Pérez Pulido, R., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Martínez Cañamero, M., Guyot, J.P., Gálvez, A. 2006. Characterization of lactobacilli isolated from caper berry fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 102, 583-590.
- Perez-Pulido, R., Ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Martínez Cañamero, M., Gálvez, A. 2005. Microbiological study of the lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture-dependent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7872-7879.
- Pfannebecker J., Fröhlich, J. 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. *Int. J. Food. Microbiol.* 128, 288-296.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 15, 546-553.

- Plengvidhya, V., Breidt, F., Lu, Jr. Z., Fleming, H.P. 2007. DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7697-7702.
- Potts, E.A., Fleming, H.P. 1982. Prevention of mold-induced softening in air-purged, brined cucumbers by acidification. *J. Food Sci.* 47, 1723-1727.
- Prasad, J., Harsharanjit, G., Smart, J., Pramod, K.G. 1999. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8, 993-1002.
- Raccach, M. 1996. Method and bacterial compositions for fermenting meats. U.S. Patent 3, 960, 664.
- Rodriguez-Palacios, A., Staempfli, H.R., Duffield, T., Weese, J.S. 2009. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *J. Appl. Microbiol.* 106, 393-401.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3-16.
- Sabir, F., Beyatli, Y., Cokmus, C., Onal-Darilmaz, D. 2010. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *J. Food Sci.* 75, 568-573.
- Sakamoto, K., Konings, W.N. 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 105-124.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., Gorbach, S.L. Lactic acid bacteria in health and disease. 1998. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Marcel Dekker, Inc. 211-253.
- Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H., Bjorkroth, J. 2005. Characterization and identification of lactic acid bacteria in "morcilla de Burgos". *Int. J. Food Microbiol.* 97, 285-296.
- Schillinger U., Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Sci. Tech.* 7, 158-164.
- Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross, R.P. 2002. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed field electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 765-771.
- Simpson, P.J., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P. 2006. Enumeration and identification of pediococci in powder-based products using selective media and rapid PFGE. *J. Microbiol. Meth.* 64, 120-125.
- Simpson, W.J., Taguchi, H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. 1995. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Chapman & Hall, London, 125-172.
- Singh, A.K., Ramesh, A. 2008. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR based approach. *Food Microbiol.* 25, 278-287.
- Somers, E.B., Johnson, M.E., Wong, A.C.L. 2001. Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J. Dairy Sci.* 84, 1926-1936.
- Sponhol, W. 1993. Wine spoilage by microorganisms. In: Fleet, G.H. (Eds.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publisher, Switzerland, 395-429.
- Stamer, J.R. 1983. Lactic acid fermentation of cabbage and cucumbers. In: Reed, G. (Eds.), *Biotechnology*. Verlag Chemie, Germany, Vol. 5, 365-378.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, 891-899.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.

- Strasser de Saad, A.M., Manca de Nadra, M.C. 1987. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Cafayate (Argentina) wines. *Microbiol. Alim. Nutr.* 5, 45-49.
- Stratton, J.E., Hutkins, R.W., Sumner, S.S., Taylor, S.L. 1992. Histamine and histamine-producing bacteria in retail Swiss and low-salt cheeses. *J. of Food Prot.* 55, 435-439.
- Sukumar, G., Ghosh, A.R. 2010. *Pediococcus* spp.-A potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis. *African J. Food. Sci.* 4, 597-602.
- Swenson, J.M., Facklam, R.R., Thornsberry, C. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Ag. Chemoter.* 34, 543-549.
- Tamang, B., Tamang, J.P., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Gores, M., Holzapfel, W.H. 2008. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 35-40.
- Tamang, J.P. 1998. Role of microorganism in traditional fermented food. *Indian Food Industry.* 17, 162-167.
- Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Thawai, C., Yukphan, P., Okada, S. 2007. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53, 7-15.
- Tankovic, J., Leclercq, R., Duval, J. 1993. Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrob. Ag Chemoter* 37, 789- 792.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., Swings, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10.
- Thapa, N., Pal, J., Tamang, J. P. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of Eastern Himalayas. *Int. J. Food Microbiol.* 107, 33-38.
- Threlfall, E.J., Ward, L.R., Frost, J.A., Willshaw, G.A. 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 1-5.
- Tynkkynen, S., Satokari, R., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Saxelin, M. 1999. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3908-3914
- Tzanetaki, N., Litopolou-Tzanetaki, M. 1989. Biochemical activities of *Pediococcus pentosaceus* isolates of dairy origin. *J. Dairy Sci.* 72, 859-863.
- Ventura, M., Zink, R. 2002. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 141-154.
- Villard, L., Kodjo, A., Borges, E., Maurin, F., Richard, Y. 2000. Ribotyping and rapid identification of *Staphylococcus xylosum* by 16S-23S rDNA spacer amplification. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 83-87.
- Weiss N. The genera *Pediococcus* and *Aerococcus*. 1992. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer -Verlag, New York, Vol. 3, 2nd Edition., 1502-1507.
- Witte, W. 1997. Impact of antibiotic use in animal feeding on resistance of bacterial pathogens in humans. In: Chadwick, D.G., Goode, J. (Eds.), *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. *Ciba Foundation Symposium* 207. Wiley, Chichester, 61-75.
- Wong, A.C.L. 1991. Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* 81, 2765-2770.
- Yuksekdag, Z.N., Aslim, B. 2010. Assessment of potential probiotic and starter properties of *Pediococcus* spp. isolated from Turkish- type fermented sausage (Sucuk). *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 161-168.

- Yuksekdag, Z.N., Beyatli, Y., Aslim, B. 2004. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT-Food Sci. Technol.* 37, 663–67.
- Zambonelli, C. *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. 1998. Ed. Agricole, Bologna, 93-112.
- Zhang, B., Tong, H., Dong, X. 2006. *Pediococcus cellicola* sp. nov. isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55, 2405-2408.
- Zhang, J.G., Cai, Y., Kobayashi, R., Mukai, S. 2000. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from forage crops and their effects on silage fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1455-1460.
- Zoltai, P.T., Zottola, E.A., McKay, L.L. 1981. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk contact surfaces. *J. Food Prot.* 44, 204-208.
- Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L. 2009. Erythromycin and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausage. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1559-1568.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875-1881.