



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

La contaminazione di *Listeria monocytogenes* negli  
ortaggi e metodi naturali per contrastarne lo sviluppo

Contamination of *Listeria monocytogenes* in vegetables  
and biopreservation methods to reduce its growth

TIPO TESI: compilativa

Studente:  
ANGELICA ACQUAROLI

Relatore:  
DOTT.SSA CRISTIANA GAROFALO

Correlatore:  
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

*“Lasciate che vi dica il segreto  
che mi ha portato al successo.  
La mia forza risiede soltanto  
nella mia tenacia.”*

**Louis Pasteur**

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	4
ELENCO DELLE FIGURE .....	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI .....	6
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI .....	7
CAPITOLO 1 LA CONTAMINAZIONE MICROBICA NEI PRODOTTI ORTICOLI FRESCHI DI IV GAMMA.....	8
1.1 <i>La contaminazione microbica nei prodotti orticoli</i> .....	8
1.2 <i>Focus su Listeria monocytogenes: generalità e sviluppo nei prodotti orticoli di IV gamma</i> .....	9
CAPITOLO 2 COME LIMITARE LO SVILUPPO DI <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NEGLI ORTAGGI DI IV GAMMA CON MOLECOLE E METODI NATURALI .....	18
2.1 Il ruolo dei composti fenolici per contrastare la moltiplicazione di <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
2.1.1 Meccanismo antimicrobico dei composti fenolici a livello cellulare.....	24
2.2 Le potenzialità antimicrobiche degli estratti di legumi.....	26
2.3 Batteriocine, raggi UV e altri mezzi naturali antimicrobici.....	28
CONCLUSIONI .....	30
BIBLIOGRAFIA .....	31

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1-1: Verdure pronte al consumo e la loro contaminazione microbica (Mir et al., 2017) .....	8
Tabella 1-2: Fasi della produzione di biofilm (Galli et al., 2017).....	11
Tabella 2-1: Classificazione dei composti fenolici (Lopez-Fernandez et al., 2020).....	19
Tabella 2-2: Applicazione degli estratti fenolici per la conservazione degli ortaggi (Lopez-Fernandez et al., 2020).....	23

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Formazione progressiva biofilm <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
Figura 1-2: Coltivazione di spinaci in pieno campo .....	13
Figura 1-3: Coltivazione di spinaci.....	14
Figura 1-4: Coltivazione di rucola in serra .....	14
Figura 1-5: Spinaci raccolti e arrivati allo stabilimento di IV gamma.....	15
Figura 1-6: Spinaci sul nastro trasportatore pronti per il lavaggio.....	15
Figura 1-7: Lavaggio spinaci.....	16
Figura 1-8: Spinaci asciugati.....	17
Figura 2-1: Struttura chimica resveratrolo.....	19
Figura 2-2: Struttura chimica pterostilbene.....	20
Figura 2-3: Struttura chimica quercetina.....	20
Figura 2-4: Struttura chimica naringenina.....	20
Figura 2-5: I principali meccanismi di azione antibatterici dei composti fenolici (Lopez-Fernandez et al., 2020).....	24

## ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

EFSA European Food Safety Authority

EPS Extracellular Polymeric Substances (Esopolisaccaridi)

## INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

Il presente elaborato si propone di presentare il problema della contaminazione degli ortaggi freschi di IV gamma da parte del batterio patogeno alimentare *Listeria monocytogenes* e al contempo di dare una panoramica dei metodi naturali ad oggi presenti in letteratura per ridurre o eliminare la moltiplicazione di *L. monocytogenes* in tali prodotti.

La scelta di esporre questa tematica deriva dal fatto che *L. monocytogenes* è l'agente causale di una malattia umana chiamata listeriosi, una patologia rara ma grave in soggetti a rischio quali bambini, donne in gravidanza, immunocompromessi, anziani. Inoltre negli ultimi anni c'è stato un significativo aumento della domanda di prodotti di IV gamma, ovvero di verdure fresche pronte al consumo che possono risultare contaminate da *L. monocytogenes* e necessitano di metodi di risanamento che chiaramente non possono prevedere l'uso di calore. Questo progetto di tesi vuole ribadire l'importanza di contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes* in tali prodotti, garantendo la sicurezza alimentare, e al contempo proporre le potenzialità antimicrobiche di sostanze naturali, quali ad esempio alcuni composti fenolici in alternativa ai più comuni e noti composti chimici di sintesi sempre più evitati dai consumatori. Oggetto del primo capitolo sarà la presentazione delle caratteristiche generali di *L. monocytogenes* e la problematica del suo sviluppo nei prodotti orticoli di IV gamma.

Nel secondo capitolo si affronteranno nello specifico i diversi metodi naturali per limitare o contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes*, approfondendo particolarmente il ruolo dei composti fenolici.

# Capitolo 1

## LA CONTAMINAZIONE MICROBICA NEI PRODOTTI ORTICOLI FRESCHI DI IV GAMMA

### 1.1 La contaminazione microbica nei prodotti orticoli

Gli ortaggi possono risultare contaminati da diversi tipi di microrganismi patogeni, come *Escherichia coli* (ceppi patogeni), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., oltre che da *Listeria monocytogenes*. Quindi per garantire la sicurezza alimentare nelle aziende produttrici di ortaggi, i responsabili della qualità devono eseguire periodicamente delle analisi dei prodotti orticoli sia grezzi, sia semilavorati, sia finiti, ma devono anche verificare l'assenza di questi microrganismi nel suolo e nelle acque utilizzate per l'irrigazione. Infine, negli stabilimenti devono essere applicate correttamente tutte le norme igienico-sanitarie, comprensive anche dei tamponi sulle superfici.

In Tabella 1-1 sono riportati esempi di verdure e insalate pronte al consumo che derivano dal processo di IV gamma e i possibili microrganismi che potrebbero contaminare tali prodotti.

**Tabella 1-1 Verdure pronte al consumo e la loro contaminazione microbica (Mir et al., 2017)**

Insalate pronte al consumo	Tipi di microrganismi
Rucola, cavolo, porro, iceberg, ravanella, spinaci	<i>Escherichia coli</i>
Prezzemolo, lattuga, ravanella	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Insalate miste	<i>Listeria monocytogenes</i>
Carota, mais	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp.
Lattuga romana, spinaci, insalate miste	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>
Scarola	<i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>
Carota, lattuga, cicoria, cavolfiore	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>
Lattuga, prezzemolo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i>



## 1.2 Focus su *Listeria monocytogenes*: generalità e sviluppo nei prodotti orticoli di IV gamma

Il genere *Listeria* comprende batteri Gram +, non sporigeni, anaerobi facoltativi, con otto specie non patogene e due specie patogene che sono *Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes*.

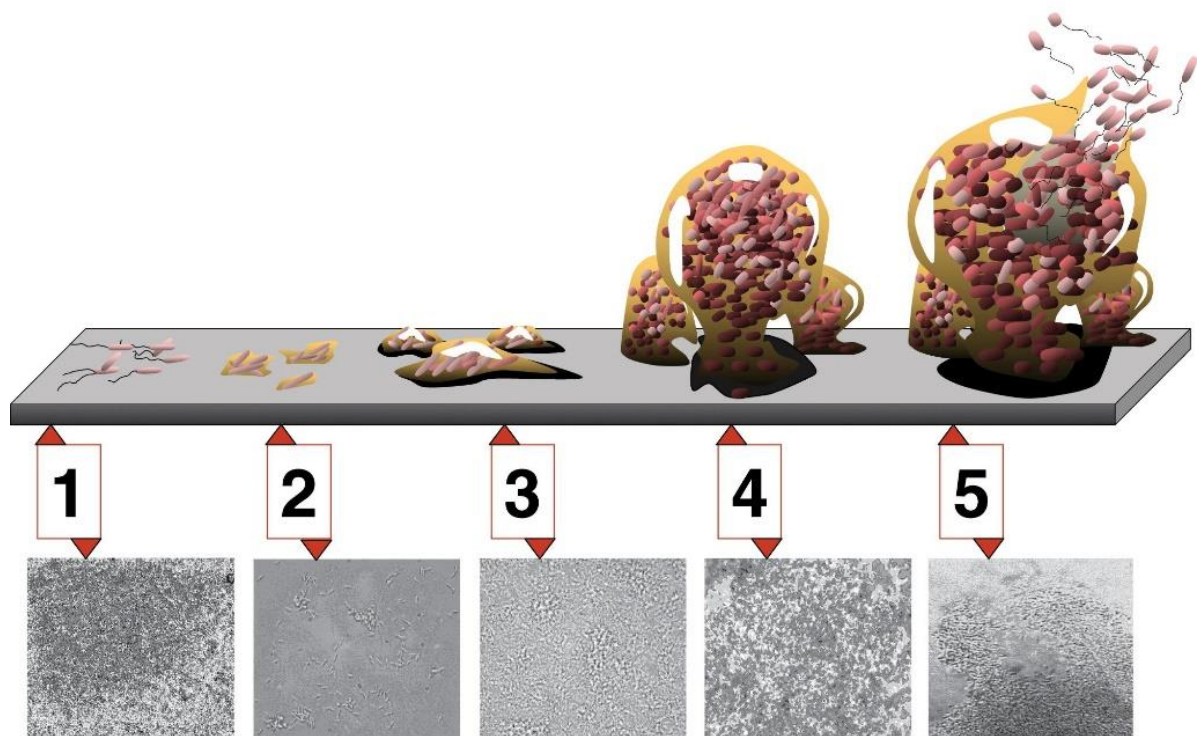
*L. monocytogenes* è uno dei più importanti patogeni alimentari nell'Unione Europea (Kallipolitis et al., 2020). *L. monocytogenes* è un microrganismo potenzialmente letale in soggetti a rischio quali soggetti debilitati da altre malattie o con sistema immunitario compromesso, bambini piccoli, donne in gravidanza, anziani ed è l'agente eziologico della malattia chiamata listeriosi. Nonostante l'elevata mortalità (fino al 40% dei casi) associata alla listeriosi alimentare, complessivamente la malattia è piuttosto rara. Nell'uomo la listeriosi non è caratterizzata da un unico quadro clinico, poiché il decorso della malattia dipende dallo stato dell'ospite. Individui sani, non in gravidanza e non immunodepressi sono altamente resistenti alle infezioni da *L. monocytogenes*. Invece, la listeriosi contratta in gravidanza determina spesso aborto, nascita prematura o morte del feto. Quando un neonato viene infettato al momento del parto, i sintomi della listeriosi sono quelli tipici della meningite. Inoltre, quando individui adulti suscettibili contraggono la malattia, i sintomi più frequenti sono meningite e sepsi (Jay et al., 2009).

*L. monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario in natura, pertanto può essere trovato sia nell'ambiente agricolo sia nell'ambiente di produzione alimentare e nei prodotti alimentari. La capacità di questo batterio di sopravvivere in molteplici habitat si basa sulle sue caratteristiche metaboliche. Infatti, *L. monocytogenes* è un patogeno intracellulare in grado di crescere a temperature comprese tra -0,4 °C e 45 °C, con temperatura ottimale a 30-37 °C, a valori di pH compresi tra 4,0 e 9,6 (con un intervallo ottimale tra 6 e 8) e con un minimo di attività dell'acqua di 0,90 ( $a_w$ ). Questo patogeno è stato isolato da un'ampia gamma di matrici alimentari, quali formaggi, carne, latte crudo, frutti di mare e verdure fresche come insalate, spinaci, baby leaf, bietole, cicorie, ravanelli, cavoli.

Uno dei metodi che potrebbe aiutare a ridurre la sua presenza negli alimenti è basato sulla corretta applicazione dell'approccio preventivo rappresentato dal sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points). Dall'analisi della letteratura è emerso che i principali fattori di rischio inerenti *L. monocytogenes* sono i seguenti: scarsa qualità microbiologica di materie prime, contaminazione crociata, pratiche di pulizia inadeguate, temperature di conservazione non conformi, processi di preparazione non idonei e la mancanza di formazione del personale in materia di igiene e sicurezza alimentare (Osimani et al., 2016). Pertanto, al fine di garantire la sicurezza degli alimenti, si può evitare o ridurre la contaminazione di *L.*

*monocytogenes* mediante il lavaggio delle mani, l'uso dei guanti, la separazione delle materie prime dai prodotti finiti, la disinfezione delle superfici e delle attrezzature (Osimani et al., 2016). La grande attenzione riguardo la disinfezione delle superfici e attrezzature è anche dovuta al fatto che *L. monocytogenes* è anche un agente di produzione di biofilm. Per biofilm si intende una comunità di diverse cellule batteriche adese ad una superficie, incorporate in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari autoprodotte, in particolare polisaccaridi (EPS). La presenza di biofilm su superfici di lavoro o su utensili e attrezzature comporta il rischio che si stacchino delle cellule, contaminando gli alimenti solidi o liquidi entrati in contatto con la superficie. Infatti, poiché gli strati superiori del biofilm oppongono una minore resistenza all'asportazione, parte dei polisaccaridi e dei microrganismi presenti saranno trasferiti al prodotto, con conseguente contaminazione. L'attenzione per i biofilm è aumentata dalla fine degli anni ottanta, quando è stato dimostrato che *L. monocytogenes* aderisce anche all'acciaio inossidabile formando un biofilm (Marriott et al., 2008).

La formazione di biofilm è un processo complesso che prevede una serie di fasi successive e che si ripetono in modo ciclico (Figura 1-1- e Tab 1-2).



**Figura 1-1** Formazione progressiva biofilm *Listeria monocytogenes*

**Tabella 1-2 Fasi della produzione di biofilm (Galli et al., 2017)**

<b>FASE</b>	<b>FENOMENO</b>	<b>CARATTERISTICHE</b>
I fase Adsorbimento	Le cellule in forma planctonica (cellula isolata fluttuante) entrano in contatto con una superficie	Fase spontanea, rapida e reversibile
II fase Fissazione	Ancoraggio dei microrganismi adesi alla superficie, grazie alla produzione di sostanze di natura polisaccaridica (EPS) e di estroflessioni	Processo lento (metabolismo del microrganismo) irreversibile
III-IV fase Colonizzazione	Formazione di microcolonie sempre più grandi	Si crea una vera e propria nicchia ecologica, un ecosistema
V fase Rottura	Liberazione di cellule in forma planctonica	In prossimità di una superficie riprende il ciclo

La matrice del biofilm di *L. monocytogenes* è composta da acidi teicoici e da EPS che agiscono sia come un'impalcatura strutturale sia come una barriera protettiva prevenendo l'essiccazione (garantendo la ritenzione idrica) e agendo come una riserva di energia (mediante assorbimento di composti organici e inorganici). Inoltre questi componenti del biofilm sono dotati di attività enzimatica. Le cellule del biofilm mostrano delle modifiche strutturali e fisiologiche, quali il cambio della loro forma, la crescita più lenta e diventano più resistenti agli antibiotici e ai disinfettanti (Brauge et al., 2016).

La presenza di biofilm nell'industria alimentare rappresenta un grosso problema, infatti a seguito della sua rottura è possibile:

- La liberazione di microrganismi indicatori di qualità che andranno a ridurre la *shelf life* del prodotto che verrà contaminato
- La liberazione di cellule patogene
- La riduzione dell'efficienza degli impianti industriali e fenomeni di biocorrosione (Galli et al., 2017).

La formazione dei biofilm avviene generalmente quando le procedure di sanificazione non vengono eseguite correttamente; in questo caso, i residui di alimenti sulle superfici possono

favorire lo sviluppo dei microrganismi, quindi è essenziale il monitoraggio microbico delle superfici e l'applicazione di adeguati piani di sanificazione (Osimani et al., 2016). Inoltre, i biofilm di *L. monocytogenes* sono di particolare preoccupazione, in quanto risultano resistenti a disinfettanti e igienizzanti, rendendo la loro eliminazione dagli impianti di trasformazione alimentare una grande sfida (Mah and O'Toole et al., 2001).

*L. monocytogenes* è un microrganismo molto versatile e questo è un prerequisito per la sua persistenza. Ci sono sia fattori intrinseci sia estrinseci che contribuiscono alla grande diffusione e alla persistenza di *L. monocytogenes* in parecchi habitat (ambiente naturale esterno, biofilm, alimenti). I fattori estrinseci sono rappresentati dall'ambiente di coltivazione delle verdure, ovvero ci potrebbe essere una contaminazione in fase di pre-raccolta delle verdure dovuta a suolo contaminato da *L. monocytogenes* oppure a causa della presenza del microrganismo nell'acqua utilizzata per l'irrigazione. Quindi, al fine di limitare il rischio di trasmissione è necessario porre attenzione alle pratiche agricole utilizzate eseguendo frequentemente analisi microbiologiche delle acque utilizzate per l'irrigazione, verificando l'assenza di *L. monocytogenes* e di altri microrganismi patogeni.

*L. monocytogenes* può sopravvivere e crescere in diverse condizioni ambientali come temperature di refrigerazione, pH basso, alta concentrazione salina. Queste caratteristiche metaboliche consentono al patogeno di superare i principali metodi di conservazione degli alimenti quali, la refrigerazione o la salagione, rappresentando un rischio potenziale per la salute umana. La sopravvivenza e la crescita di *L. monocytogenes* a temperature di refrigerazione (2-4 °C) rende difficile il controllo di questo patogeno alimentare (Rocourt e Cossart et al., 1997). I prodotti orticoli di IV gamma vengono conservati a temperature di refrigerazione. Infatti, nello stabilimento di produzione e trasformazione di IV gamma nelle celle di stoccaggio le temperature sono inferiori a 8°C, mentre negli ambienti di lavoro sono inferiori a 14°C. Il motivo è aumentare la *shelf life* di questi prodotti, evitandone il deterioramento ma si espone l'alimento al possibile sviluppo di *L. monocytogenes* se è avvenuta una contaminazione precedente.

Di seguito vengono mostrate le fasi di produzione degli ortaggi di IV gamma, dalla coltivazione delle verdure in campo al processo di trasformazione nello stabilimento, durante le quali è necessario prestare attenzione al possibile rischio di contaminazione da parte di *L. monocytogenes* e di altri microrganismi patogeni.



*Figura 1-2 Coltivazione di spinaci in pieno campo*



*Figura 1-3 Coltivazione di spinaci*



*Figura 1-4 Coltivazione di rucola in serra*



*Figura 1-5 Spinaci raccolti e arrivati allo stabilimento di IV gamma*



*Figura 1-6 Spinaci sul nastro trasportatore pronti per il lavaggio*



*Figura 1-7 Lavaggio spinaci*

Il lavaggio è uno dei metodi più comuni per rimuovere le particelle di terra e altri corpi estranei. Avviene con acqua fredda, potabile e gorgogliante.

Nell'industria alimentare il prodotto chimico disinfettante maggiormente utilizzato durante il lavaggio è il biossido di cloro, per la sua forte attività antibatterica e il basso costo.

La prime due vasche di lavaggio prevedono la presenza di biossido di cloro in acqua (le concentrazioni sono tra 0.1 e 5 ppm nella prima vasca e 0.1 e 0.4 ppm nella seconda vasca) per abbattere la carica microbica, mentre nella terza vasca è presente solo acqua per il risciacquo.





***Figura 1-8 Spinaci asciugati***

Dopo che le verdure sono state lavate e asciugate, verrà pesata la giusta quantità che deve contenere ogni busta, così si otterranno i prodotti finali di IV gamma destinati alla grande distribuzione organizzata.

## Capitolo 2

### COME LIMITARE LO SVILUPPO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEGLI ORTAGGI DI IV GAMMA CON MOLECOLE E METODI NATURALI

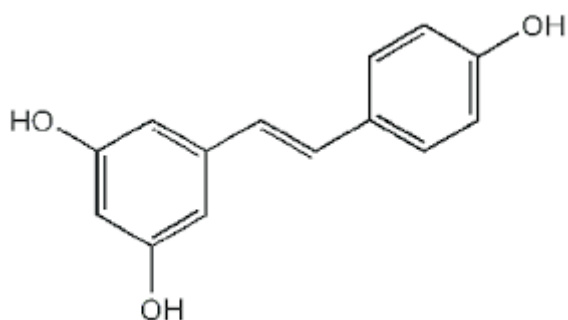
#### 2.1 Il ruolo dei composti fenolici per contrastare la moltiplicazione di *Listeria monocytogenes*

È aumentato l'interesse da parte dei produttori di alimenti per gli antimicrobici naturali sia perché sono presenti sempre più normative che prevedono delle restrizioni relative all'uso di additivi chimici sia per la sfiducia dei consumatori nei confronti dei prodotti chimici di sintesi. I composti fenolici sono stati studiati come una delle principali alternative agli additivi sintetici, grazie al loro effetto inibitorio di microrganismi patogeni (Bouarab-Chibane et al., 2019). Negli ultimi anni sono stati sempre più frequenti gli studi, da parte di ricercatori, relativamente alle potenzialità antimicrobiche e antiossidanti dei composti fenolici, i quali sembrano avere un ruolo importante anche nel contrastare la moltiplicazione di *L. monocytogenes*, aumentandone così il loro utilizzo nell'industria per scopi di sicurezza alimentare (Shahidi & Ambigaipalan et al., 2015).

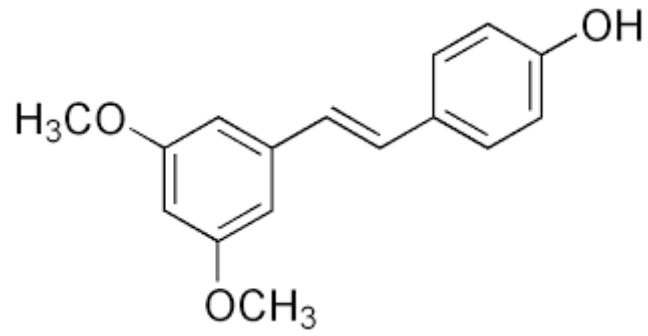
I polifenoli sono prodotti idrosolubili ottenuti dal metabolismo secondario dei vegetali e comprendono una classe eterogenea di composti con diverse strutture chimiche (Lopez-Fernandez, et al., 2020; Tab 2-1).

**Tabella 2-1 Classificazione dei composti fenolici (Lopez-Fernandez et al., 2020)**

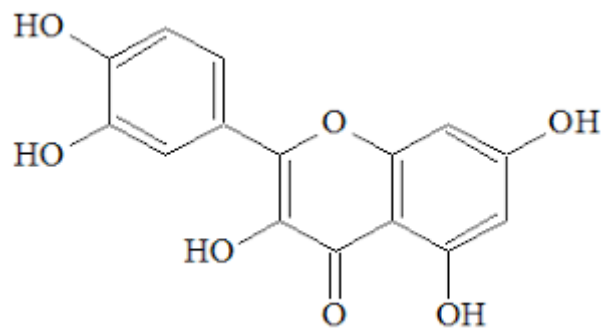
Gruppi basati sulla struttura chimica	Famiglie composti fenolici	Principali composti
Composti fenolici non flavonoidi	Acidi fenolici Derivati idrossibenzoico Derivati idrossicinnamico	p-idrossibenzoico, protocatecuico, vanillico, gallico, acido siringico quattro molecole di base: p-cumarico, caffeico, ferulico e acido sinapico
	Derivati cumarina	cumarina, scopoletina, umbelliferone, esculetina
	Stilbeni	resveratrolo, piceide, astringina, pterostilbene
Composti fenolici flavonoidi	Antociani	cianidina, delphinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina
	Flavonoli	quattro agliconi: quercetina, campferolo, miricetina e isoramnetina
	Flavani	catechine, epicatechine, galocatechine
	Flavoni	apigenina, luteolina
	Flavanoli	engelina, astilbina
	Flavanoni	naringenina, esperetina
	Calconi	florizina



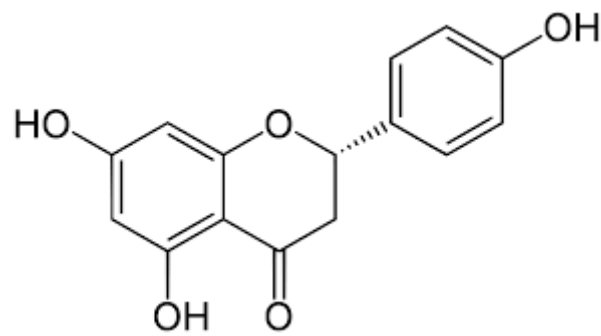
**Figura 2-1 Struttura chimica resveratrolo**



*Figura 2-2 Struttura chimica pterostilbene*



*Figura 2-3 Struttura chimica quercetina*



*Figura 2-4 Struttura chimica naringenina*

I polifenoli, in particolare gli acidi fenolici e i flavonoidi, possono essere considerati come conservanti alimentari naturali, in quanto riescono ad inibire la capacità di *L. monocytogenes* di moltiplicare e di formare biofilm. Tuttavia, l'efficacia nel contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes* da parte dei composti fenolici dipende anche dalle tipologie di matrici alimentari, dalle condizioni di lavorazione e conservazione e da molti altri fattori tra cui anche il ceppo batterico e la struttura del composto. Infatti, i composti fenolici includono tantissime molecole, ma solo alcuni di essi hanno proprietà protettive da *L. monocytogenes*. Ad esempio, è stato osservato che carvacrolo, timolo, eugenolo, aldeide cinnamica, inibiscono la crescita di *L. monocytogenes* ad una concentrazione minima inibente (MIC) di 65, 150, 90 e 65 µg/mL, rispettivamente (Alves et al., 2016). Inoltre, ci sono composti che hanno mostrato un'attività anti-listeria con concentrazione minima inibente inferiore a 512 µg/mL. I fenoli che hanno queste caratteristiche sono butile, ottile, gallato, gallato di propile e due composti fenolici naturali, quali naringenina e quercetina (Alves et al., 2017).

È stato esaminato anche l'effetto antimicrobico di 35 composti fenolici (3 stilbeni, 8 acidi cinnamici, 6 acidi benzoici, 11 flavonoidi, 5 cumarina e 2 naftochinoni) alla concentrazione di 1 g/L (Bouarab-Chibane et al., 2019). Dallo studio si evince che *L. monocytogenes* era suscettibile nei confronti di tutti i polifenoli esaminati, in particolare, stilbeni, resveratrolo e pinosilvinina si sono rivelati dei composti antimicrobici molto attivi per contrastare *L. monocytogenes* (Bouarab-Chibane et al., 2019). Inoltre, tra gli acidi benzoici, il gallato di butile ha dimostrato la potenzialità antimicrobica più alta (Bouarab-Chibane et al., 2019). Mentre tra gli 11 flavonoidi esaminati (Bouarab-Chibane et al., 2019) solo 4 hanno mostrato attività antibatterica. Questi flavonoidi erano: gallato di epigallocatechina, quercetina 3-β-D-glucoside, taxifolina, miricitrina.

Acido gallico, acido ferulico, acido caffeico e acido clorogenico potrebbero creare condizioni sfavorevoli per l'adesione batterica. Pertanto, i composti fenolici possono essere considerati anche eccellenti candidati per prevenire la formazione dei biofilm (Luis et al., 2014).

Inoltre, è stato studiato il potenziale antibatterico del chitosano, un composto di natura polisaccaridica, che addizionato di acido caffeico, ferulico e sinapico sembra contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes*. Questi acidi fenolici con il chitosano hanno mostrato una migliore attività anti-listeria e anti-biofilm rispetto al chitosano non modificato (Kim et al., 2018).

Sono anche state svolte delle ricerche relative ad estratti ottenuti da diversi frutti e piante con alto contenuto di composti fenolici, dimostrando la loro attività antimicrobica ed il loro possibile utilizzo nelle industrie alimentari. Infatti, estratti di mirtillo rosso ed estratti di

composti fenolici dalle uve (varietà Red Globe e Carignan) riducono l'adesione di *L. monocytogenes* alle superfici di acciaio inox e di polipropilene, inibendo completamente la motilità batterica (Vázquez-Armenta et al., 2018). In precedenza, sono stati svolti altri studi *in vitro* relativamente alle proprietà antimicrobiche degli estratti vegetali ricchi di polifenoli, in grado di contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes*, quali estratti di caffè e di tè, di bucce di mandorle ricchi di flavonoidi, estratti di mirtillo rosso con elevate quantità di antociani, flavonoli e acidi fenolici (Monente et al., 2015).

Gli estratti di foglie di olivo che contengono, tra i vari composti, oleuropeina, riescono a inibire completamente la crescita di *L. monocytogenes*, ad una concentrazione di 62.5 mg/mL (Liu et al., 2017). La maggior parte dell'oleuropeina viene persa nelle acque reflue durante il processo di produzione dell'olio di oliva, quindi gli estratti purificati di queste acque presentano effetto battericida contro *L. monocytogenes* (Fasolato et al., 2015).

Altri estratti ricchi di composti fenolici sono quelli che si ricavano dai tegumenti di *Ginkgo biloba* (Carraturo et al., 2014) e dalla frazione idroalcolica e di acetato di etile ottenuta da *Rumex tingitanus*. Anche questi estratti hanno mostrato un'attività antagonista nei confronti dello sviluppo di *L. monocytogenes*.

È interessante notare che alcuni estratti ricchi di polifenoli provenienti da alcune piante sono dei potenziali conservanti naturali degli ortaggi perché hanno dimostrato la capacità di inibire lo sviluppo di *L. monocytogenes* direttamente in queste matrici. In particolare, l'estratto del raspo dell'uva è stato usato come un "disinfettante anti-listeria" nella lattuga e negli spinaci (Vázquez-Armenta et al., 2017). In dettaglio, campioni di questi ortaggi sono stati inoculati con 6 log CFU/g di *L. monocytogenes* e ogni campione è stato immerso per due minuti in una soluzione di estratto di stelo di uva (25 g/L). Al termine dell'esperimento, in seguito a conta vitale in piastra, è stata osservata una riduzione della carica batterica di 0.86 log CFU/g nella lattuga e di 1.06 log CFU/g negli spinaci (Tab 2-2).

**Tabella 2-2 Applicazione degli estratti fenolici per la conservazione degli ortaggi (Lopez-Fernandez et al., 2020)**

Applicazioni		Estratti fenolici	Condizioni del processo	Effetti
Ortaggi	<b>Lattuga</b>	25 mg/mL di soluzione di stelo di uva	Immersione per 2 minuti	Riduzione di 0.86 log CFU/g
	<b>Spinaci</b>	25 mg/mL di soluzione di stelo di uva	Immersione per 2 minuti	Riduzione di 1.06 log CFU/g

Ci sono diverse strategie da mettere in atto per l'applicazione dei composti fenolici come conservanti naturali degli alimenti. Un metodo comune è l'aggiunta diretta di tali sostanze come additivi o agenti sciolti in una soluzione e l'applicazione per immersione, nebulizzazione e lavaggio (Vàzquez-Armenta et al., 2017).

Inoltre, i composti fenolici possono essere abbinati con altri prodotti antimicrobici per ottenere un'attività antibatterica sinergica.

Attualmente, una tecnologia che si sta affermando è rappresentata da imballaggi attivi caratterizzati dalla presenza di composti funzionali bioattivi come i composti fenolici. Infatti, film ottenuti da gusci di mandorle, pannocchie di mais o estratti di vinacce hanno mostrato azione inibitoria contro *L. monocytogenes* (Moreira et al., 2016). Al contrario, film commestibili di acai con 3% di olio essenziale di timo e 3% di polifenoli estratti dalle bucce di mele non hanno un'attività anti-listeria (Espitia et al., 2014).

L'uso di questi estratti ricchi di polifenoli ottenuti dai vegetali come quelli sopra elencati, ha anche il vantaggio di riutilizzare i residui dell'industria agroalimentare (ad esempio, da olive, mirtili rossi, vinacce). Inoltre, il prodotto trattato con questi estratti non ne risulta alterato nel colore e nelle caratteristiche organolettiche, incontrando l'approvazione dei consumatori (Alirezalu et al., 2020).

### 2.1.1.1 Meccanismo antimicrobico dei composti fenolici a livello cellulare

I composti fenolici mostrano attività antibatterica causando la perdita dei costituenti cellulari, il collasso della membrana citoplasmatica batterica e la morte cellulare.

Si possono distinguere due principali tipologie di meccanismi antimicrobici (Bouarab-Chibane et al., 2019).

Il primo meccanismo consiste nella rottura della membrana citoplasmatica, nella formazione di granuli citoplasmatici e nella modifica della permeabilità della membrana cellulare. In dettaglio, i composti fenolici si accumulano sulla superficie dei batteri tramite l'interazione con i radicali OH della membrana cellulare inducendo la rottura della membrana citoplasmatica, la perdita di contenuto cellulare e la depolarizzazione dei batteri (Bouarab-Chibane et al., 2019). Questo è il meccanismo di azione dei composti fenolici che hanno il ruolo di contrastare *L. monocytogenes*.

Invece, il secondo meccanismo prevede, mediante la formazione di legami idrogeno tra composti fenolici ed enzimi, portando alla alterazione delle funzioni intracellulari.

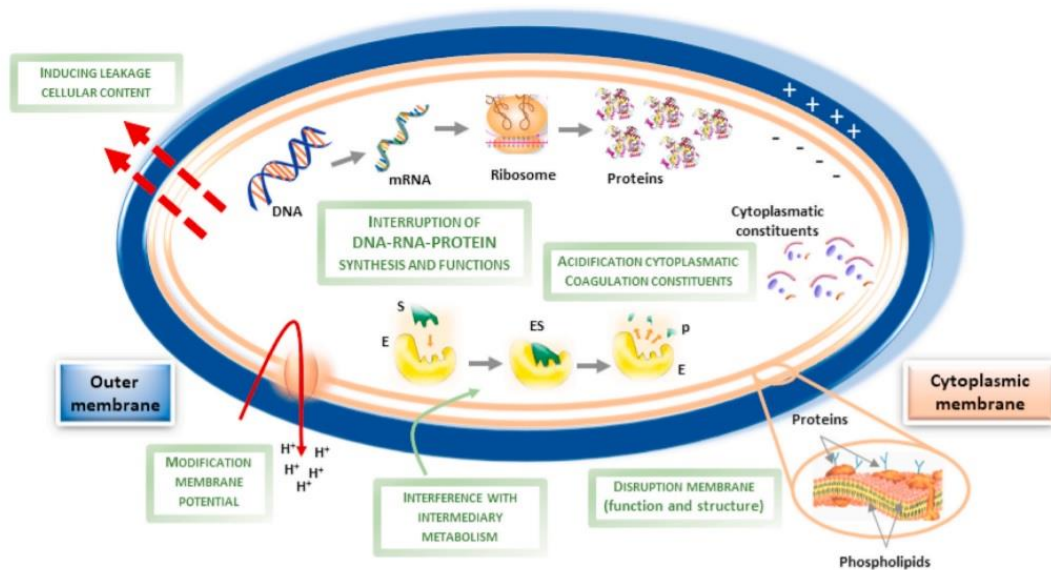


Fig. 1. Mechanisms of the action of phenolic compounds in the membrane, cytoplasm and genetic material of bacteria.

### ***Figura 2-5 I principali meccanismi di azione antibatterici dei composti fenolici (Lopez-Fernandez et al., 2020).***

Inoltre, diversi composti fenolici, quali acido ferulico, acido gallico, carvacrolo, timolo ed eugenolo causano modificazioni del pH intracellulare a causa di variazioni del flusso ionico e del blocco della produzione di energia, interferendo con il sistema di generazione dell'energia (Bouarab-Chibane et al., 2019; Rempe et al., 2017). Inoltre, acido ferulico e acido gallico



possono anche distruggere l'integrità della membrana e causare la perdita dei costituenti intracellulari.

Le cumarine possono ridurre il tasso di respirazione cellulare e inibire la proteina FtsZ implicata nella divisione batterica.

Nel caso dei flavonoidi, uno studio su resveratrolo ha mostrato che questo polifenolo potrebbe causare modifiche nella morfologia cellulare alterando il potenziale di membrana e ostacolando la sintesi del DNA (Mora-Pale et al., 2015).

I flavani possono agire con diversi meccanismi: i tannini potrebbero legarsi agli enzimi, provocando danni alla membrana cellulare e inattivando le vie metaboliche; le catechine determinano una riduzione della fluidità di membrana e possono inibire la DNA girasi (uno degli enzimi fondamentali per la sintesi del DNA) (Bouarab Chibane et al., 2019).

Altri composti fenolici, come la quercetina, disturbano il potenziale di membrana e aumentano la sua permeabilità (Bouarab Chibane et al., 2019).

Un altro meccanismo antibatterico riguarda gli estratti polifenolici delle foglie di olivo che riducono la motilità di *L. monocytogenes* eliminando i suoi flagelli (Liu et al., 2017). Infine, l'estratto di origano inibisce il quorum sensing, un utile meccanismo di adattamento di *L. monocytogenes* (Alvarez et al., 2014).

## 2.2 Le potenzialità antimicrobiche degli estratti di legumi

I batteri, compresi i patogeni alimentari, stanno sviluppando una resistenza ai tradizionali antimicrobici. Negli ultimi 30 anni, a causa della pressione selettiva causata dall'utilizzo eccessivo di prodotti chimici sintetici a livello industriale, i microrganismi hanno generato nuovi meccanismi di adattamento. Alcuni patogeni più resistenti, di maggior preoccupazione, sono in grado di sviluppare biofilm che persistono negli impianti e nelle attrezzature delle industrie alimentari e che contaminano le superfici per lunghi periodi di tempo (Pèrez-Ibarreche et al., 2016). Questo fenomeno rappresenta una minaccia per la salute pubblica, pertanto è necessario trovare delle alternative tra cui delle strategie antimicrobiche naturali ed efficaci, evitando l'utilizzo di conservanti chimici. Una di queste alternative potrebbe essere rappresentata dagli estratti di alcuni legumi. La famiglia delle Leguminose include una grande gamma di piante e semi, che oltre ad essere molto ricchi in proteine ad alto valore biologico, carboidrati, vitamine e minerali, si sono rivelate fonti naturali di antiossidanti e di sostanze antimicrobiche. Queste sostanze si localizzano non solo a livello di semi ma anche nelle parti aeree, nei baccelli e nelle radici delle piante. I principali composti bioattivi nei legumi con potenziale antimicrobico sono: i polifenoli, le proteine, i peptidi, le lectine (Pina-Pèrez et al., 2017).

La soia ed i ceci sono tra i legumi con la più elevata potenzialità antimicrobica per contrastare lo sviluppo dei patogeni alimentari. In particolare, alcune proteine di soia e di ceci sono state studiate per il loro potenziale antimicrobico in grado di contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes*. I peptidi di soia a lunga catena hanno un alto potenziale antimicrobico contro batteri patogeni Gram + e Gram -. Anche molte proteine e peptidi presenti negli estratti di ceci presentano attività antimicrobiche (Pina-Pèrez et al., 2017). Dallo studio di Sitohy et al. (2013) è emerso che le proteine metilate di entrambi i legumi hanno inibito per il 97% la crescita di *L. monocytogenes* dopo un periodo di esposizione di 6-12 ore. Il potenziale antimicrobico di queste proteine è stato attribuito alle subunità metilate che interagiscono con la parete cellulare e la membrana cellulare, producendo canali e pori, provocando infine la lisi e la morte dei microrganismi patogeni. La struttura e la sequenza degli aminoacidi nei peptidi antimicrobici sono i principali fattori responsabili della loro efficacia come antimicrobici. Sembra che lunghe catene di peptidi di soia siano più efficaci contro *L. monocytogenes* rispetto ai peptidi a corta catena.

I flavonoidi e le epicatechine sono classi di composti fenolici dominanti nei legumi. In particolare, i principali composti fenolici presenti nei legumi sono: acido protocatecuico, acido idrossibenzoico, acido vanillico, acido caffeico, acido siringico, vanillina, acido ferulico, acido

sinapico, acido cumarico, acido benzoico, acido ellagico e acido cinnamico (Khang et al., 2016).

Considerando che i legumi sono ricchi di polifenoli, negli ultimi anni sono stati effettuati alcuni studi che si occupano del potenziale antiossidante degli estratti di legumi. I principali polifenoli nei legumi sono concentrati nelle radici, nei semi o parti aeree. I meccanismi antimicrobici dei polifenoli sono i seguenti: destabilizzazione della membrana citoplasmatica, permeabilizzazione della membrana cellulare, privazione di micronutrienti minerali essenziali come ferro e zinco mediante chelazione e interferenza diretta nel metabolismo (Daglia et al., 2012).

In conclusione, la famiglia delle Leguminose è un gruppo di piante molto promettente, grazie alle potenzialità dei legumi come fonti alternative di antimicrobici naturali per contrastare lo sviluppo dei patogeni alimentari. Al fine di garantire l'accumulo della massima concentrazione dei composti desiderati in queste piante, si dovrebbero mettere in atto degli interventi sia in coltivazione sia in post-raccolta per incrementare l'apporto dei composti bioattivi con proprietà antimicrobiche (Pina-Pèrez et al., 2017).

### 2.3 Batteriocine, raggi UV e altri mezzi naturali antimicrobici

Le industrie produttrici di ortaggi di IV gamma stanno cercando delle alternative per sostituire i trattamenti chimici con dei conservanti naturali, al fine di garantire la sicurezza alimentare. Un metodo naturale utile per il controllo dei patogeni alimentari riguarda l'utilizzo delle batteriocine, le quali sono prodotte dai batteri lattici e possono essere usate in ambito alimentare. I batteri lattici producono diversi composti antimicrobici, tra cui le batteriocine che sono dei peptidi antimicrobici, le quali sono considerate conservanti naturali sicuri, in quanto, in seguito ad ingestione dell'alimento, verranno degradate dalle proteasi nel tratto gastrointestinale (Cleveland et al., 2001). La batteriocina più studiata e disponibile in commercio è la nisina che viene prodotta dal batterio *Lactococcus lactis*. Sono stati valutati gli effetti derivanti dal lavaggio delle verdure di IV gamma con soluzioni contenenti batteriocine (Allende et al., 2007) e si è osservata una riduzione della vitalità di *L. monocytogenes* di 1,2-1,6 unità logaritmiche subito dopo il trattamento. Tuttavia, durante la conservazione a 4°C, i trattamenti con batteriocine hanno esercitato solo un controllo minimo sulla crescita di questo patogeno. Pertanto, le batteriocine oggetto dello studio non riescono ad inibire completamente la crescita del patogeno sulla lattuga di IV gamma, dopo un lungo periodo di conservazione (7 giorni), a 4°C. Tuttavia, queste batteriocine sono in grado di diminuire la carica iniziale di *L. monocytogenes*. Perciò, l'uso di soluzioni ad alta concentrazione di batteriocine potrebbe essere utilizzato insieme ad altri agenti o disinfettanti inibitori.

Inoltre, è stata valutata l'efficacia dei raggi ultravioletti (UV) erogati in acqua (WUV) oppure in acido peracetico (PAA), al fine di inattivare e inibire *L. monocytogenes* su insalata iceberg e spinacino di IV gamma. La luce ultravioletta a onde corte ha un effetto diretto e deleterio sulla struttura del DNA microbico, determinando l'inattivazione e la morte di molti microrganismi, senza produrre sottoprodotti nocivi (Gayà et al., 2014). Tra i disinfettanti chimici ossidanti, l'acido peracetico è un alternativo adatto, grazie al suo ampio raggio di azione (Alvaro et al., 2009). Dallo studio emerge che grazie ai trattamenti con i raggi UV, uso di acido peracetico insieme a *Pseudomonas graminis CPA-7*, è stato possibile inibire la crescita di *L. monocytogenes* su insalata iceberg, dopo 6 giorni di conservazione refrigerata. Il ruolo di *Pseudomonas graminis CPA-7* è stato quello di aumentare l'effetto inibitorio di *L. monocytogenes*, in combinazione ai raggi UV e all'acido peracetico.

Infine, tra gli altri mezzi antimicrobici naturali si annoverano anche altri due composti quali il benzoato di sodio e il sorbato di potassio. Sono due conservanti rispettivamente E211 e E202. È stato dimostrato che gli effetti sinergici di questi due composti unitamente a bassi valori di

pH e basse temperature permettono il controllo della crescita di *L. monocytogenes* in maniera potenziata rispetto ai soli conservanti testati singolarmente.

## CONCLUSIONI

In conclusione, è possibile sostenere che le contaminazioni di *L. monocytogenes* negli ortaggi sono frequenti, soprattutto nei casi in cui si praticano inadeguate tecniche di coltivazione e non si effettuano gli opportuni controlli delle acque utilizzate per l'irrigazione, al fine di verificare l'assenza di questo patogeno alimentare. Quindi, è importante la prevenzione iniziando dai controlli in campagna, ma sono fondamentali anche tutte le successive fasi di lavorazione degli ortaggi. In particolare, il lavaggio delle verdure e l'applicazione di tutte le norme igienico-sanitarie previste, comprensive anche dei tamponi periodici sulle superfici negli stabilimenti di produzione dei prodotti di IV gamma, del mantenimento della catena del freddo, e delle analisi dei prodotti grezzi, semilavorati e finiti.

Per quanto riguarda *L. monocytogenes*, va anche considerato che la temperatura di refrigerazione non rappresenta un ostacolo al suo sviluppo, ma anzi una condizione di crescita, sottolineando ancora di più l'importanza di evitare la contaminazione in fase di pre-raccolta e utilizzare adeguati metodi antimicrobici.

I diversi studi presi in considerazione hanno mostrato l'importanza e l'utilità di ricercare delle strategie alternative per poter sostituire i prodotti antimicrobici di sintesi con molecole naturali e con l'applicazione di metodi alternativi.

Pertanto, è apparso evidente come alcuni dei composti fenolici oggetto degli studi possano essere valutati come uno strumento efficace per contrastare la moltiplicazione di *L. monocytogenes* in alimenti che non possono essere sottoposti a cottura come gli ortaggi di quarta gamma. Relativamente ad altri mezzi naturali antimicrobici, quali gli estratti da leguminose, l'uso di batteriocine e raggi UV ci sono ancora poche applicazioni in ambito alimentare, ma gli studi ad oggi analizzati risultano promettenti.

Infine, deve essere compiuto un ampliamento degli studi e delle ricerche, così da conoscere dettagliatamente i meccanismi antimicrobici di queste molecole naturali e soprattutto arrivare a dimostrarne l'efficacia per contrastare lo sviluppo di *L. monocytogenes* e di altri microrganismi patogeni alimentari direttamente nelle matrici alimentari.

## BIBLIOGRAFIA

- Osimani A. & Clementi F., 2016. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in mass catering: An overview in the European Union. *International Journal of Hospitality Management*, pp. 9-17.
- Kallipolitis B., Gahan C. GM & Piveteau P., 2020. Factors contributing to *Listeria monocytogenes* transmission and impact on food safety. *Current Opinion in Food Science*, pp. 9-17.
- Mir S. A., Shah M. A., Mir M. M., Dar B.N., Greiner R. & Roohinejad S., 2017. Microbiological contamination of ready-to-eat vegetables salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food control*, pp. 235-244.
- Zamuz S., Munekata P. E.S., Dzuvor C K.O, Zhang W., Sant'Ana A. S. & Lorenzo J M., 2020. The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food. A review. *Trends in Food Science & Technology*.
- Pina-Pèrez M.C. & Ferrùs Pèrez M.A., 2017. Antimicrobial potential of legume extracts against foodborne pathogens: A review. *Trends in Food Science & Technology*, pp. 114-124.
- Allende A., Martínez B., Selma V., Gil M. I., Suárez J. E. & Rodríguez A., 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes in vitro* and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology*, pp. 759-766.
- Collazo C., Noguera V., Aguilò-Aguayo I., Abdadias M., Colàs-Medà P., Nicolau I. & Vinas I., 2019. Assessing water-assisted UV-C light and its combination with peroxyacetic acid and *Pseudomonas graminis* CPA-7 for the inactivation and inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in fresh-cut Iceberg lettuce and baby spinach leaves. *International Journal of Food Microbiology*, pp. 11-20.
- Necidová L., Mrnousová B., Harustiaková D., Bursová S., Janstová B. & Golian J., 2019. The effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *LWT – Food Science and Technology*, pp. 1-7.

Galli A., Bertoldi A., Franzetti L., 2017. Contaminanti biologici. Igiene degli alimenti e HACCP. Roma: ECP editore, p. 42.

Marriott N. G., Gravani R. B., 2008. Microrganismi e sanificazione. Sanificazione nell'industria alimentare. Milano: Springer- Verlag Italia, p. 28.

Jay J. M., Loessner M. J., Golden D. A., 2009. Microbiologia degli alimenti. Springer, p. 656.