

# **Gram negativi di interesse alimentare**

# Batteri acetici

## Batteri acetici – caratteristiche generali

I batteri acetici sono Gram-negativi, aerobi obbligati, catalasi positivi e di forma elissoide o a bastoncino.

La loro caratteristica distintiva è la capacità di ossidare etanolo in acido acetico in presenza di ossigeno.

Crescono ottimamente a pH 5-6,5, ma possono svilupparsi anche a valori inferiori a 3.

Sono generalmente mesofili (28-30 °C), ma alcune specie sono termotolleranti (35-38 °C),

Possono anche produrre CO<sub>2</sub>, acido gluconico, pigmenti solubili e EPS con funzione emulsionante e prebiotica.

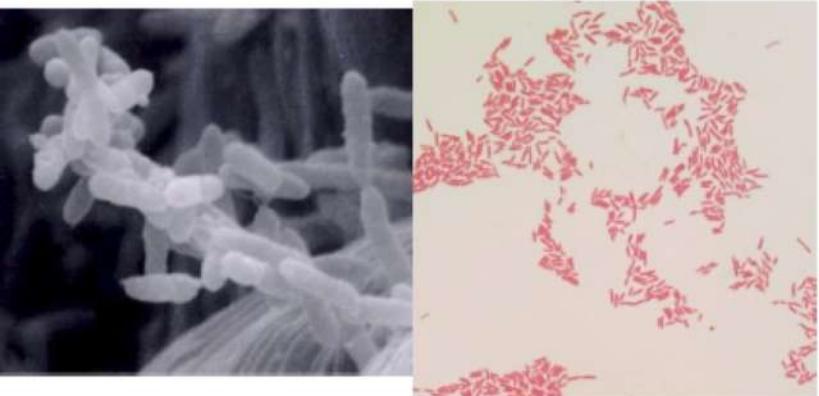
I batteri acetici possono avere un ruolo pro-tecnologico o alterante negli alimenti e nelle bevande.

### **Ruolo pro-tecnologico:**

- Produzione di aceto
- Fermentazione di vegetali come kombucha (lieviti + batteri acetici)
- Fermentazione delle fave di cacao (lieviti + LAB + batteri acetici)

### **Ruolo alterante:**

- Modifica indesiderata di vino, birra, sidro, succhi di frutta, yogurt

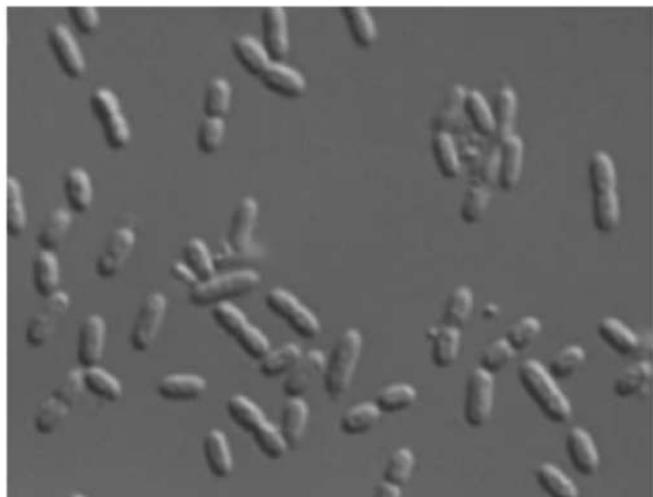


### ***Acetobacter***

Genere conosciuto da più tempo

Bastoncini (non sempre mobili)

In grado di ossidare completamente l'etanolo ad acqua e CO<sub>2</sub>



### ***Gluconobacter***

Bastoncini mobili (flagelli)

Ossidano parzialmente l'alcol (etanolo) ad acido acetico

Ossidazione glucosio ad acido gluconico

# **Enterobatteri: Panoramica e Concetti Chiave**

Gli **Enterobatteri** sono un gruppo vasto e cruciale di batteri nell'ambito della microbiologia degli alimenti. Sono spesso usati come indicatori igienico-sanitari

### Tassonomia moderna (2016)

Vecchia famiglia *Enterobacteriaceae* suddivisa in:

*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*,  
*Morganellaceae*, *Budviciaceae*

Nuove inclusioni: *Cronobacter* (da *Enterobacter sakazakii*)

### Habitat, Ubiquitarietà e Classificazione

Tratto intestinale di mammiferi (uomo incluso) e uccelli.

Si ritrovano in suolo, acqua, piante, insetti e a tutti i livelli della catena alimentare.

Molti sono commensali (es. ceppi innocui di *E. coli*), ma molti sono patogeni per uomo, animali e piante.

# Caratteristiche Morfologiche e Fisiologiche

Bacilli **Gram negativi**, asporogeni.

Aerobi/anaerobi facoltativi.

- Enzimi chiave:

- Ossidasi Negativi (tratto distintivo fondamentale, eccetto *Plesiomonas spp.*).
- Catalasi Positivi (eccetto *Shigella dysenteriae 1* e *Xenorhabdus spp.*).

- Metabolismo:

- Fermentazione: Capacità di fermentare numerosi carboidrati, con produzione di acidi e gas da D-glucosio (caratteristica diagnostica chiave).
- Lattosio: Alcuni generi (es. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) sono fermentanti il lattosio e sono noti come Coliformi.
- Riduzione Nitrato: Capaci di ridurre il nitrato a nitrito (tranne alcune eccezioni)

- Mobilità: Solitamente mobili grazie a flagelli peritrichi (es. *Salmonella*), ma i generi *Shigella* e *Tatumella* sono immobili.

## Importanza igienico-sanitaria

Indicatori di contaminazione fecale: coliformi, *E. coli*

Patogeni alimentari rilevanti:

- *Salmonella enterica*
- *E. coli* STEC/VTEC
- *Yersinia enterocolitica*
- *Cronobacter sakazakii*

# Fattori Ambientali e Sopravvivenza

## Parametro

## Temperatura

## Attività dell'Acqua (aw)

## pH

## Caratteristiche

Mesofili (ottimali 15-40 °C)

Psicrotrofi (*Yersinia enterocolitica*,  
alcuni *Citrobacter*, *Enterobacter* ecc.)

Termotolleranti (*E. coli*, *K. oxytoca*)

Minima aw 0,95

Tolleranza a bassa aw (*Salmonella*,  
*Cronobacter spp.*, *E. coli* patogeni)

Range di crescita: 3,8-9,0

Tolleranza all'acidità (*E. coli* patogeni)

## Rilevanza per gli Alimenti

La maggior parte è inattivata dalle  
pastorizzazioni standard.

Possono crescere a temperature di  
refrigerazione

Crescita oltre i 44 °C

La maggior parte richiede molta acqua.

Sopravvivono in alimenti secchi o a  
basso tenore di umidità (cioccolato,  
latte in polvere, biscotti, carni  
fermentate).

Sensibili a pH bassi.

Alcuni ceppi patogeni possono  
sviluppare a pH < 3,8 (es. carni  
fermentate).

## ***Food spoilage da enterobatteri psicrotrofi***

*Serratia, Enterobacter e Hafnia* sono responsabili di alterazione in:

- latte pasteurizzato refrigerato
- carne in ATM
- prodotti minimamente processati

## ***Yersinia enterocolitica e consumo di carne suina***

Ceppi psicrotrofi → rischio anche durante refrigerazione.

Presente in carne suina e prodotti derivati.

## Metabolismo in Aerobiosi e Anaerobiosi

Gli Enterobatteri sono **aerobi/anaerobi facoltativi**

In **aerobiosi** (respirazione), utilizzano composti semplici come acidi organici, amminoacidi e carboidrati.

In **anaerobiosi** (fermentazione), la crescita dipende strettamente dal carboidrato (monosaccaridi, disaccaridi, polialcoli); l'utilizzo di polisaccaridi è raro (*Erwinia*).

La capacità di fermentare il lattosio è presente in generi come *Escherichia* ed *Enterobacter* grazie agli enzimi galattoside permeasi e beta-galattosidasi.

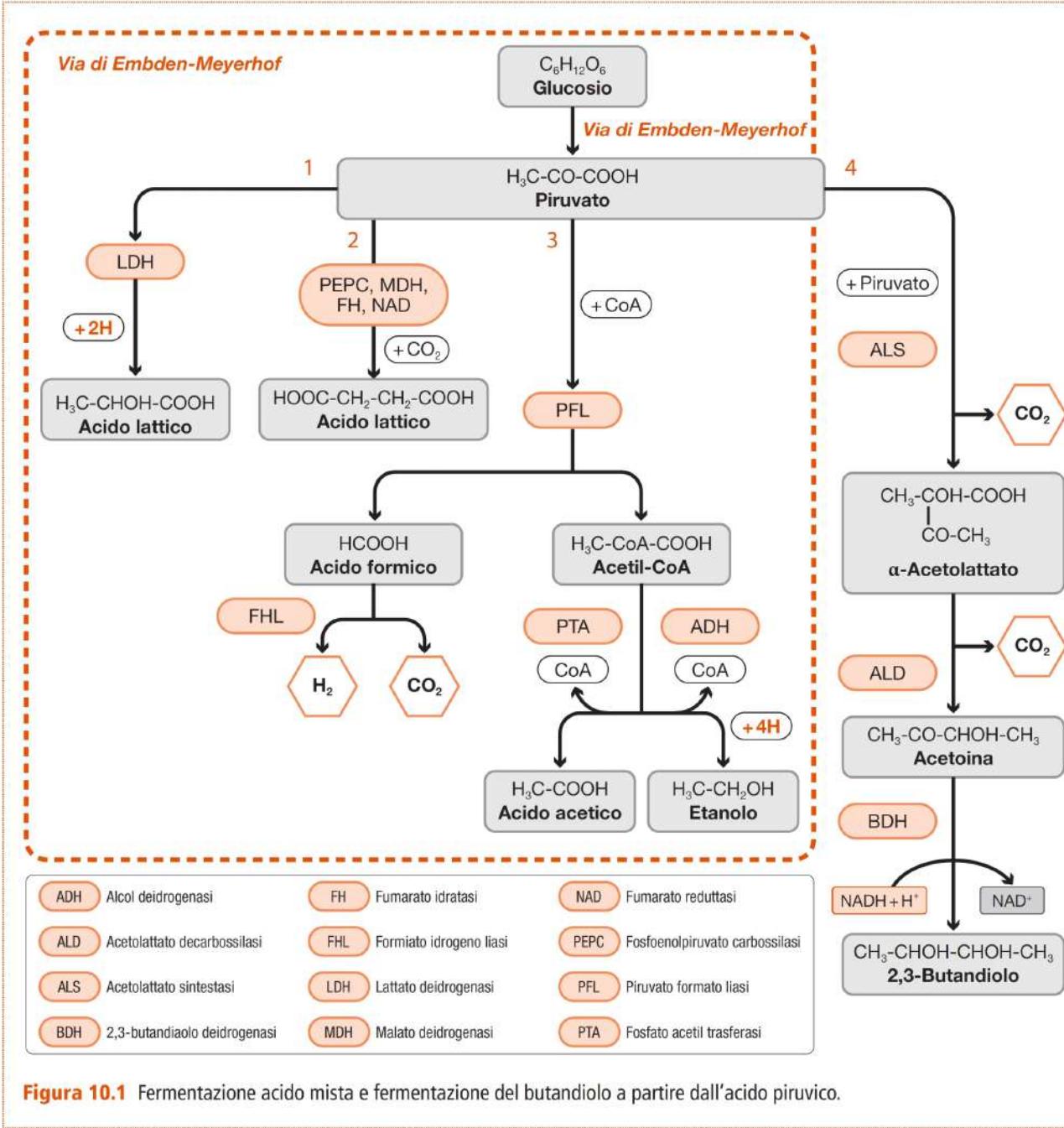
*Shigella*, *Salmonella* e *Proteus* sono tipicamente non-fermentanti il lattosio.

## **Le Due Principali Vie di Fermentazione del Glucosio**

La differenziazione dei generi di Enterobatteri si basa sulla proporzione dei prodotti finali della fermentazione anaerobica del glucosio. Si distinguono due tipi fondamentali di fermentazione:

**Fermentazione Acido-Mista:** Elevata quantità di acidi.

**Fermentazione del 2,3-Butandiolo:** prodotti neutri come butandiolo ed etanolo.



**Tabella 10.2** Risposte diagnostiche per alcuni generi di enterobatteri in merito alla capacità di produrre butandiolo, gas da glucosio e fermentare il lattosio.

Genere	Capacità di produrre 2,3-butandiolo	Capacità di produrre gas da glucosio	Capacità di fermentare il lattosio
<i>Escherichia</i>	No	Sì	Sì
<i>Shigella</i>	No	No	Sì/No
<i>Salmonella</i>	No	Sì	Sì/No
<i>Citrobacter</i>	No	Sì	Sì
<i>Klebsiella</i>	Sì/No	Sì	Sì
<i>Enterobacter</i>	Sì	Sì	Sì
<i>Proteus</i>	No	Sì/No	No
<i>Providencia</i>	No	No	No

Alcuni enterobatteri possono causare malattia anche in persone sane (come *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, alcuni ceppi di *E. coli*), mentre altri provocano infezioni soprattutto in persone con difese immunitarie basse (come *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, ecc.).

La patogenicità dipende molto dalla struttura esterna della cellula batterica e dagli antigeni:

- **Antigene O** → parte dei lipopolisaccaridi (LPS)
- **Antigene H** → flagelli
- **Antigene K** → capsula

Specie come *Salmonella* ed *E. coli* vengono suddivise in **sierotipi** proprio in base a questi antigeni.

## Resistenza agli antibiotici

Gli enterobatteri erano in origine sensibili a molte classi di antibiotici, ma negli ultimi anni hanno sviluppato numerose **resistenze acquisite**, trasmissibili:

- verticalmente (da cellula madre a figlia)
- orizzontalmente (tra batteri tramite plasmidi)

Cause:

uso improprio di antibiotici in medicina umana e veterinaria  
scarse condizioni igieniche  
uso di antibiotici negli allevamenti

Le resistenze più importanti riguardano:

- **β-lattamici** (cefalosporine e carbapenemi)
- **fluorochinoloni**

L'Italia è tra i Paesi europei con le percentuali di resistenza più elevate (attestata al 33-34% nel 2014, raddoppiata rispetto al 2005). Le infezioni batteriche multiresistenti colpiscono dal 7% al 10% dei pazienti italiani.

## Ruolo degli enterobatteri negli alimenti

Gli enterobatteri possono trovarsi negli alimenti in due modi:

1. come microbiota naturale (soprattutto in alimenti vegetali)
2. per contaminazione, spesso di origine fecale o ambientale, dopo la produzione.

### Enterobatteri e spoilage (deterioramento alimentare)

Molti enterobatteri contaminano alimenti come:

- carne e pollame (*Escherichia, Proteus, Salmonella*)
- vegetali (*Erwinia, Pectobacterium, Citrobacter, Klebsiella, Serratia*)
- alimenti vari (*Enterobacter, Hafnia, Yersinia*)

Quando crescono negli alimenti, possono provocare alterazioni perché producono:  
enzimi che degradano proteine, lipidi, carboidrati

gas

composti volatili

pigmenti anomali



## Latte e latticini

- Amarezza
- Gonfiore precoce
- Deterioramenti di colore e viscosità



## Carne

- Odori forti da degradazione proteica



## Pesce

- TMA (odore di pesce)
- Produzione di istamina → rischio tossinfezione



## Vegetali

- Marciume molle da degradazione delle pectine

## **Enterobatteri come Indicatori e Marker negli Alimenti**

Gli Enterobatteri e, in particolare, i Coliformi, sono ampiamente utilizzati per valutare la qualità igienica e microbiologica degli alimenti.

### Indicatori di Processo

La loro presenza in prodotti trattati (termicamente, congelati, fermentati) indica un processo tecnologico inadeguato o una contaminazione successiva alla produzione.

### Indicatori di Contaminazione Fecale

I Coliformi sono genericamente considerati indicatori di contaminazione ambientale.  
*Escherichia coli* è l'indicatore prevalente di contaminazione fecale

### Microrganismi Indice (Marker)

un organismo non patogeno, ma simile per localizzazione e vie di trasmissione ai patogeni.  
*E. coli* non è solo un indicatore di contaminazione fecale, ma agisce anche come microrganismo marker per la possibile co-presenza di patogeni enterici correlati, come *Salmonella*.

In Europa esistono piani di campionamento e limiti stabiliti per il livello delle *Enterobacteriaceae* e di *E. coli* come indicatori di igiene negli alimenti, secondo quanto stabilito dal reg. CE 2073/2005 e successivi emendamenti

Prodotto	Indicatore	Limiti		Metodo
		m*	M**	
Latte trattato termicamente	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 10 ufc/ml		ISO 21528-1
Latte in polvere e siero di latte in polvere	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 10 ufc/g		ISO 21528-2
Latte coagulato, creme di latte coagulate, prodotti a base di latte liquidi o gelificati, yogurt e latti fermentati, gelati e dessert a base di latte congelati	<i>Escherichia coli</i>	< 10 ufc/g		ISO 16649-2
	<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 10 ufc/ml		ISO 21528-2
		< 10 ufc/g		ISO 21528-2
Burro e panna	<i>Escherichia coli</i>	m = 10 ufc/g	M = 100 ufc/g	ISO 21528-2
		m = 10 ufc/g	M = 100 ufc/g	ISO 16649-2
Formaggi e prodotti a base di latte o siero di latte	<i>Escherichia coli</i>	m = 100 ufc/g	M = 1000 ufc/g	ISO 16649-2
		< 10 ufc/g		ISO 16649-2
		< 10 000 ufc/g		ISO 16649-2
Frutta e ortaggi pretagliati pronti al consumo (IV gamma), semi germogliati pronti al consumo	<i>Escherichia coli</i>	Assente in 25 g		AFNOR BIO 12/25-05/09, ISO/TS 13136
		m = 100 ufc/g	M = 1000 ufc/g	ISO 16649-2
		< 100 ufc/g		ISO 16649-2
Succhi e nettari di frutta o di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	<i>Escherichia coli</i>	Assente in 25 g		AFNOR BIO 12/25-05/09, ISO/TS 13136
		m = 100 ufc/g	M = 1000 ufc/g	ISO 16649-2
		< 100 ufc/g		AFNOR BIO 12/25-05/09, ISO/TS 13136
Preparazioni alimentari/gastronomiche pronte per il consumo (es. caprese, sushi, pasta al pesto, panini farciti, carne all'albese, insalata russa, insalata di pollo, capricciosa, supplì, arrosti, lasagne, salse, sughi ecc.)	<i>Enterobacteriaceae</i>	< 1000 ufc/g		ISO 21528-2
		< 100 ufc/g		ISO 21528-2
	<i>Escherichia coli</i>	< 10 ufc/g		ISO 16649-2
		< 100 ufc/g		ISO 16649-2
Preparazioni vendute sfuse o con preincarto, periodo di conservabilità < 5 giorni	<i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC)	Assente in 25 g		AFNOR BIO 12/25-05/09, ISO/TS 13136
Spezie (es. cannella, pepe), erbe aromatiche fresche (es. basilico, prezzemolo)	<i>Escherichia coli</i>	< 10 ufc/g		ISO 16649-2

\*m = valore numerico che costituisce il limite entro il quale il risultato è accettabile. \*\*M

# Rilevamento degli Enterobatteri negli alimenti \_ *Enterobacteriaceae*

VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR

Code: CM0485

A glucose-containing selective medium for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* in food products

Typical Formula*	gm/litre
Yeast extract	3.0
Peptone	7.0
Sodium chloride	5.0
Bile Salts No.3	1.5
Glucose	10.0
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.002
Agar	12.0
pH 7.4 ± 0.2 @ 25°C	

*Enterobacteriaceae*:  
colonie di colore rosso,  
viola intenso  
*Non-Enterobacteriaceae*:  
Colonie incolori



Terreno selettivo

Fattore limitante per altre popolazioni: **Sali biliari**

Doppio strato dopo inclusione: **limitato accesso ad O<sub>2</sub> (condizione semi-aerobica)**

**ISO 21528 (08/2004):**

- 1) **Rilevazione:** Pre-arricchimento selettivo (BPW) → arricchimento selettivo → isolamento su VRBGA → test di conferma (ossidasi; crescita su cromogenico BCP dextrose agar)
- 2) **Enumerazione:** Diluizioni decimali → Conta su VRBGA → test di conferma (ossidasi; crescita su cromogenico BCP dextrose agar)

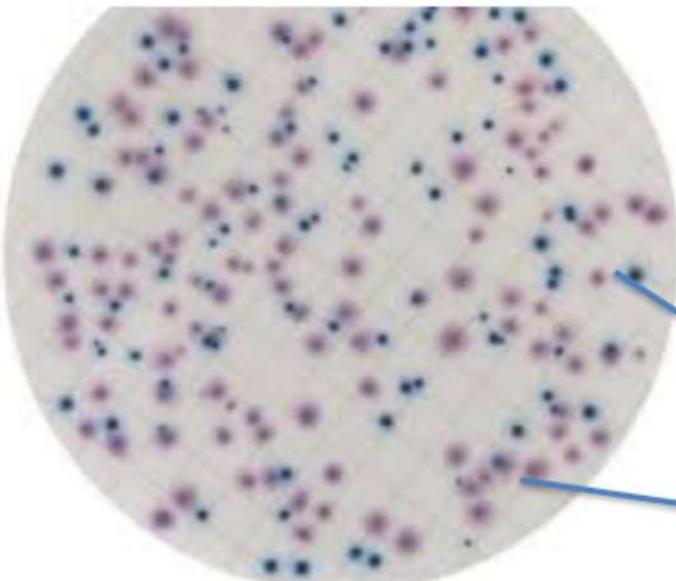
# Rilevamento degli Enterobatteri negli alimenti \_ Coliformi/*E. coli*

## Chromogenic Coliform Agar (Dehydrated)

Catalog number: CM1205B

- The chromogen Salmon GAL, when cleaved by D-galactosidase, produces a pink to red coloration; this coloration and enzyme are associated with coliforms.
- E.coli* contains D-galactosidase, which cleaves Salmon GAL; however, it also contains D-glucuronidase, which cleaves the chromogen X-glucuronide. The combination of these chromogens produces a dark blue to violet coloration associated with *E.coli*.
- Tergitol-7 within the medium inhibits Gram positive bacteria and Gram negative bacteria with exception of coliforms.

## Terreno selettivo e differenziale



Chromocult agar  
(per enterobatteri)

*Escherichia coli* (blu)

Coliformi totali (rosa)

Necessità di ulteriori test su base metabolica per l'identificazione dell'isolato

1. Test dell'ossidasi
2. Enterotubi (test miniaturizzati)

Settore	REAZIONI BIOCHIMICHE	Colore settore	
		Reazione positiva	Reazione negativa
<i>Glucose / Gas</i>	Fermentazione del glucosio	giallo	rosso
	Produzione di gas	cera staccata	cera adesa
<i>Lysine</i>	Decarbossilazione della lisina	viola	giallo
<i>Ornithine</i>	Decarbossilazione dell'ornitina	viola	giallo
<i>H<sub>2</sub>S / Indole</i>	Produzione di idrogeno solforato	nero-marrone	beige
	Produzione di indolo	rosa-rosso	incolore
<i>Adonitol</i>	Fermentazione adonitolo	giallo	rosso
<i>Lactose</i>	Fermentazione lattosio	giallo	rosso
<i>Arabinose</i>	Fermentazione arabinosio	giallo	rosso
<i>Sorbitol</i>	Fermentazione sorbitolo	giallo	rosso
<i>VP</i>	Produzione di acetoina	rosso	incolore
<i>Dulcitol / PA</i>	Fermentazione del dulcitolo	giallo	verde
	Deaminazione della fenilalanina	marrone scuro	verde
<i>Urea</i>	Idrolisi dell'urea	porpora	beige
<i>Citrate</i>	Utilizzazione del citrato	blu	verde

***Pseudomonas* spp.** sono batteri Gram-negativi, aerobici obbligati e dotati di metabolismo respiratorio con ossidasi positiva.

Questi microrganismi si ritrovano comunemente in ambienti acquatici, comprese le acque minerali, e nel suolo.

Hanno la capacità di utilizzare una vasta gamma di substrati per la crescita, mostrando una crescita particolarmente rapida in ambienti ricchi di nutrienti.

Tollerano:

- pH fino a 5,5
- attività dell’acqua (aw) fino a 0,97

#### Attività enzimatiche e metaboliche

Produzione di proteasi e lipasi → degradano proteine e lipidi

Sintesi di pigmenti colorati → alterazioni visive

