

Gram negativi di interesse alimentare

Batteri acetici

Batteri acetici – caratteristiche generali

I batteri acetici sono Gram-negativi, aerobi obbligati, catalasi positivi e di forma elissoidale 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 CO₂, acido gluconico, pigmenti solubili e EPS con funzione emulsionante e prebiotica.

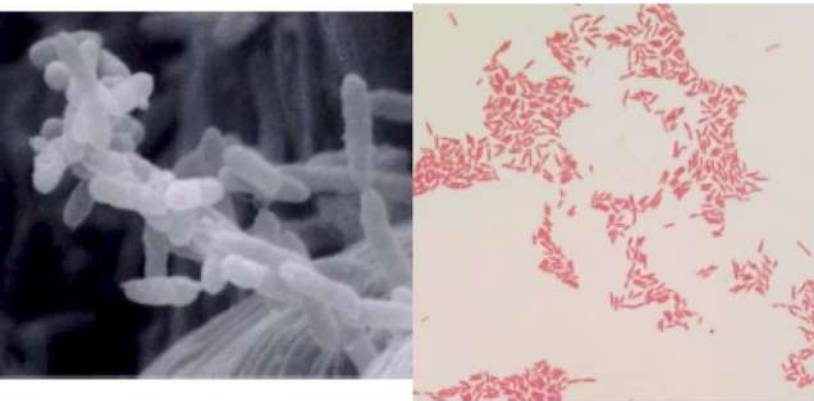
I batteri acetici possono avere un ruolo pro-tecnologico o alterante negli alimenti e nelle bevande.

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

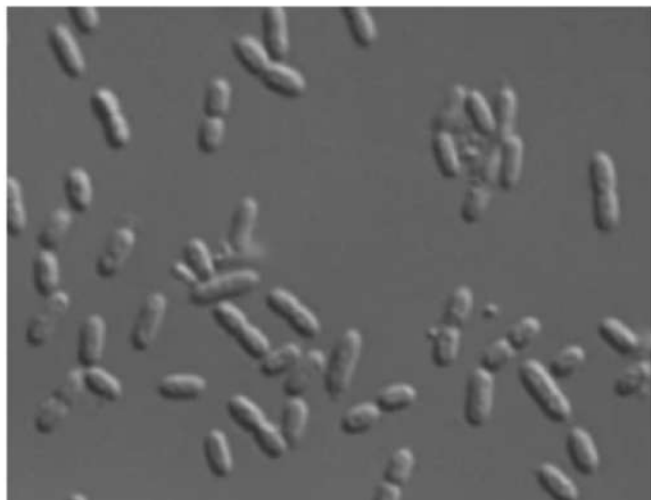


Acetobacter

Genere conosciuto da più tempo

Bastoncini (non sempre mobili)

In grado di ossidare completamente l'etanolo ad acqua e CO_2



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**, asporigeni.

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	Caratteristiche	Rilevanza per gli Alimenti
Temperatura	Mesofili (ottimali 15-40 °C)	La maggior parte è inattivata dalle pastorizzazioni standard.
	Psicrotrofi (<i>Yersinia enterocolitica</i> , alcuni <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> ecc.)	Possono crescere a temperature di refrigerazione
	Termotolleranti (<i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i>)	Crescita oltre i 44 °C
Attività dell'Acqua (aw)	Minima aw 0,95	La maggior parte richiede molta acqua.
	Tolleranza a bassa aw (<i>Salmonella</i> , <i>Cronobacter spp.</i> , <i>E. coli</i> patogeni)	Sopravvivono in alimenti secchi o a basso tenore di umidità (cioccolato, latte in polvere, biscotti, carni fermentate).
pH	Range di crescita: 3,8-9,0	Sensibili a pH bassi.
	Tolleranza all'acidità (<i>E. coli</i> patogeni)	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 pastorizzato 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.

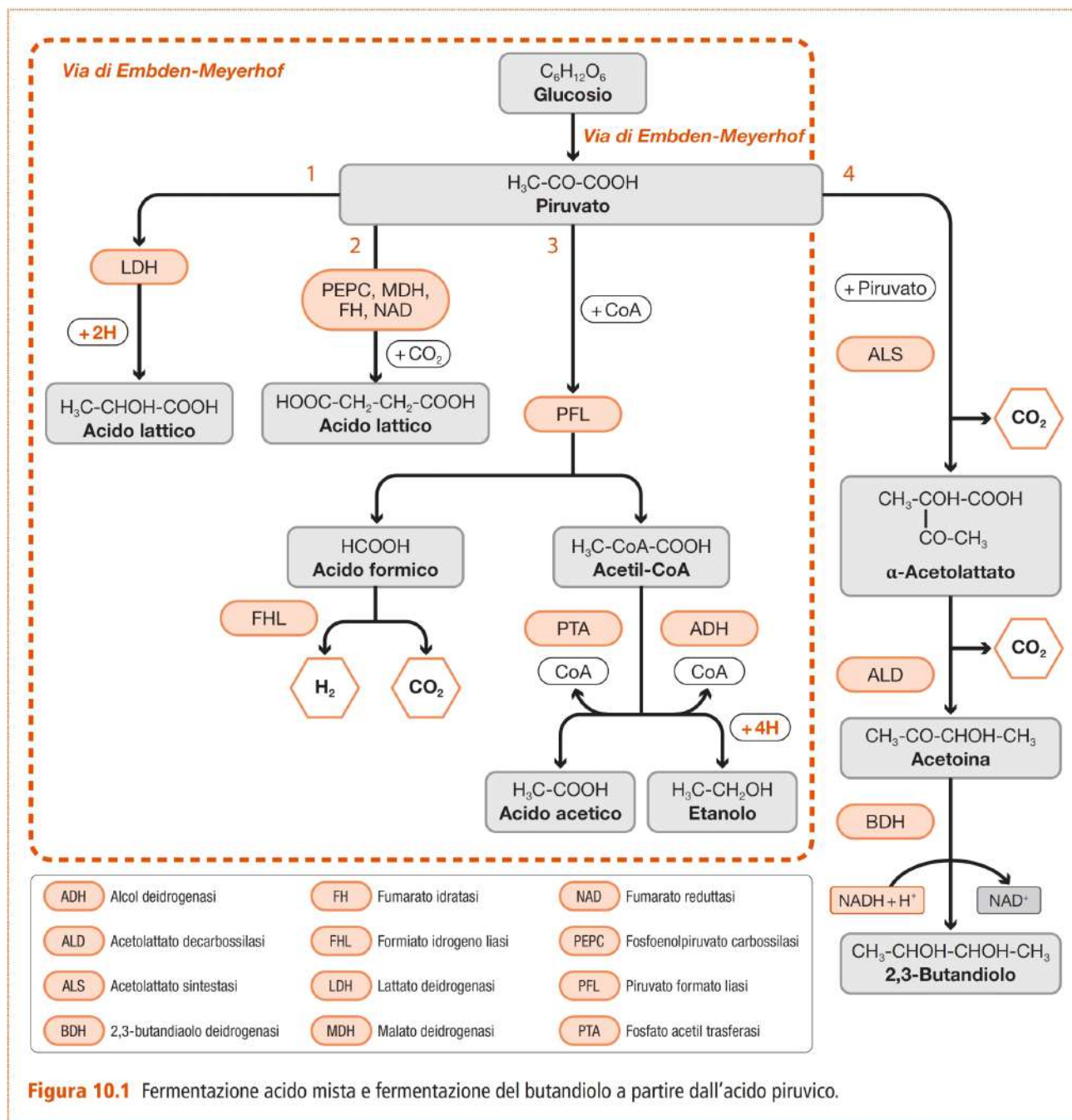


Figura 10.1 Fermentazione acido mista e fermentazione del butandiolo a partire dall'acido piruvico.

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	Enterobacteriaceae	≤ 10 ufc/ml		ISO 21528-1
Latte in polvere e siero di latte in polvere	Enterobacteriaceae	≤ 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
	Enterobacteriaceae	≤ 10 ufc/ml		ISO 21528-2
		< 10 ufc/g		ISO 21528-2
		m = 10 ufc/g	M = 100 ufc/g	ISO 21528-2
Burro e panna	<i>Escherichia coli</i>	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
	<i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC)	Assente in 25 g		AFNOR BIO 12/25-05/09, ISO/TS 13136
Frutta e ortaggi pretagliati pronti al consumo (IV gamma), semi germogliati pronti al consumo	<i>Escherichia coli</i>	m = 100 ufc/g	M = 1000 ufc/g	ISO 16649-2
		< 100 ufc/g		ISO 16649-2
	<i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC)	Assente in 25 g		AFNOR BIO 12/25-05/09, ISO/TS 13136
Succhi e nettari di frutta o di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	<i>Escherichia coli</i>	m = 100 ufc/g	M = 1000 ufc/g	ISO 16649-2
	<i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC)	Assente in 25 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, suppli, arrosti, lasagne, salse, sughi ecc.)	Enterobacteriaceae	< 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 O₂ (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)

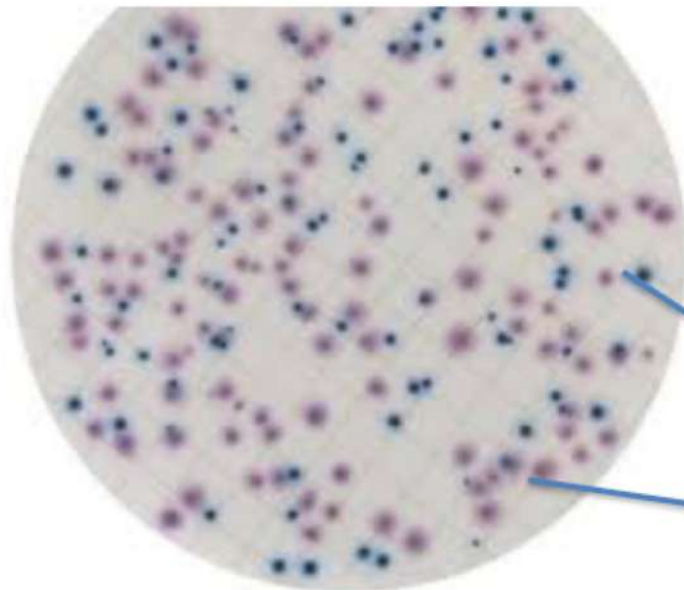
Rilevamento degli Enterobatteri negli alimenti_ Coliformi/*E. coli*

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
Glucose / Gas	Fermentazione del glucosio	giallo	rosso
	Produzione di gas	cera staccata	cera adesa
Lysine	Decarbossilazione della lisina	viola	giallo
Ornithine	Decarbossilazione dell'ornitina	viola	giallo
H₂S / Indole	Produzione di idrogeno solforato	nero-marrone	beige
	Produzione di indolo	rosa-rosso	incolore
Adonitol	Fermentazione adonitolo	giallo	rosso
Lactose	Fermentazione lattosio	giallo	rosso
Arabinose	Fermentazione arabinosio	giallo	rosso
Sorbitol	Fermentazione sorbitolo	giallo	rosso
VP	Produzione di acetoina	rosso	incolore
Dulcitol / PA	Fermentazione del dulcitolo	giallo	verde
	Deaminazione della fenilalanina	marrone scuro	verde
Urea	Idrolisi dell'urea	porpora	beige
Citrate	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 (a_w) fino a 0,97

Attività enzimatiche e metaboliche

Produzione di proteasi e lipasi → degradano
proteine e lipidi

Sintesi di pigmenti colorati → alterazioni visive

