



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

**Persistenza di batteri patogeni isolati
dall'industria alimentare:
studio di colture a lungo termine di *Listeria monocytogenes***

Relatore:

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatore:

Dott.ssa Rosaria Lucchini

Laureanda:

Sara Baldessarini

Matricola 2026910

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Indice

| | |
|--|-----------|
| Abstract | 5 |
| Introduzione..... | 7 |
| 1. <i>Listeria monocytogenes</i> | 7 |
| 1.1 Caratteristiche generali..... | 7 |
| 1.2 Patogenesi e fattori di virulenza | 8 |
| 1.3 Listeriosi..... | 11 |
| 1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> negli alimenti..... | 12 |
| 2. Persistenza dei batteri in risposta agli stress | 18 |
| 2.1 Persistenza batterica | 18 |
| 2.2 Persistenza di <i>Listeria monocytogenes</i> e possibili meccanismi molecolari | 20 |
| 2.3 Biofilm | 24 |
| 2.4 Cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) | 25 |
| 3. Scopo della tesi | 28 |
| Materiali e metodi | 29 |
| 1. Preparazione dei ceppi | 29 |
| 2. Curve di crescita..... | 29 |
| 3. Preparazione delle <i>long-term cultures</i> | 30 |
| 3.1 Conta su piastra al tempo zero | 31 |
| 4. Monitoraggio delle <i>long-term cultures</i> | 32 |
| 4.1 Conta su piastra | 32 |
| 4.2 Estrazione del DNA | 32 |
| 4.3 PCR real-time..... | 33 |
| 4.4 Costruzione di una curva standard | 34 |
| 4.5 Test del biofilm | 34 |

| | |
|---|------------|
| 5. Soluzioni e terreni utilizzati | 35 |
| Risultati..... | 39 |
| 1. Selezione dei ceppi per l'esperimento di <i>long-term cultures</i> | 39 |
| 2. Curve di crescita..... | 39 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 246 | 40 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 113 | 42 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 19111 | 44 |
| 3. Conta su piastra al tempo zero | 47 |
| 4. Monitoraggio delle <i>long-term cultures</i> | 47 |
| 5. Monitoraggio delle <i>long-term cultures</i> – conta su piastra | 48 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 246 | 48 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 113 | 51 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 19111 | 61 |
| 6. Monitoraggio delle <i>long-term cultures</i> – PCR real-time | 70 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 113 | 71 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 19111 | 73 |
| 6.1 Costruzione delle curve standard | 74 |
| 7. Monitoraggio delle <i>long-term cultures</i> – test del biofilm..... | 79 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 246 | 79 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 113 | 82 |
| <i>Listeria monocytogenes</i> 19111 | 86 |
| Discussione..... | 93 |
| Conclusione..... | 101 |
| Bibliografia | 103 |
| Sitografia..... | 109 |

Abstract

Listeria monocytogenes è un batterio patogeno agente di tossinfezioni alimentari associato a gravi problemi di salute pubblica. Questo batterio viene trasmesso all'uomo principalmente attraverso il consumo di alimenti contaminati, portando all'insorgenza di listeriosi, una malattia che presenta un elevato tasso di ospedalizzazione e mortalità soprattutto tra i soggetti più fragili, quali bambini, anziani, donne in gravidanza e immuno-compromessi. Si tratta di un batterio ubiquitario, molto diffuso nell'ambiente, in grado di sopravvivere e proliferare in presenza di ampi range di temperatura, pH e attività dell'acqua e in grado di formare biofilm. Grazie a queste sue caratteristiche, questo patogeno trova condizioni di crescita favorevoli sulle superfici e sui macchinari all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti e questo porta spesso e volentieri alla contaminazione degli alimenti stessi. È stato osservato che *L. monocytogenes* è in grado di sopravvivere anche per lunghi periodi all'interno di questi ambienti, nonostante le operazioni di pulizia e disinfezione. Le cellule in grado di sopravvivere vengono chiamate persistenti e nonostante si mantengano geneticamente identiche alle altre cellule della popolazione, riescono a sviluppare un fenotipo transiente resistente a trattamenti o a stress di vario genere, come lo stress da mancanza di nutrienti.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare la persistenza di tre ceppi di *L. monocytogenes* isolati dall'industria alimentare inoculati in Minimal Bacterial Medium (MBM), un terreno a composizione principalmente salina che va a mimare un ambiente povero di nutrienti. I ceppi sono stati studiati per tre mesi a due diverse temperature: 4°C e 30°C. La loro crescita e sopravvivenza è stata monitorata periodicamente attraverso conta su piastra in ALOA (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium) o PCA (Plate Count Agar) e attraverso PCR real-time. In corrispondenza dell'inizio, della metà e della fine dell'esperimento è stato eseguito anche un test del biofilm. Complessivamente, è stato osservato che *L. monocytogenes* persiste per lungo tempo (almeno tre mesi) quando posta a 4°C in situazione di carenza di nutrienti. Quando posta a 30°C, invece, nella maggior parte dei casi la sua coltivabilità cala fino ad azzerarsi in circa due settimane.

Parole chiave: *Listeria monocytogenes*; persistenza; long-term culture; industria alimentare.

Introduzione

1. *Listeria monocytogenes*

1.1 Caratteristiche generali

Listeria monocytogenes è un batterio patogeno intracellulare facoltativo e agente eziologico della listeriosi, un'infezione anche di grave entità che può colpire l'uomo e altre specie animali principalmente in seguito al consumo di alimenti contaminati (Ferreira *et al.*, 2014).

Attualmente, all'interno del genere *Listeria* si ritrovano 20 specie tutte comprendenti batteri gram-positivi di forma bastoncellare. Solo due tra queste specie sono considerate patogene: *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. In particolare, entrambe le specie sono patogene nei confronti degli animali, ma solo *L. monocytogenes* sembra essere in grado di provocare tossinfezioni nell'uomo (Matle *et al.*, 2020; Orsi & Wiedmann, 2016).

In seguito allo studio di antigeni somatici e flagellari, sono stati identificati 13 sierotipi di *L. monocytogenes*, che vengono comunemente raggruppati all'interno di quattro lineages. In particolare, di marcato interesse sono i ceppi che ritroviamo all'interno del lineage I, isolati in prevalenza da casi clinici di listeriosi umana, e all'interno del lineage II, prevalentemente di origine alimentare e ambientale. Di minor interesse nell'ambito di questa tesi, invece, sono i lineages III e IV che comprendono ceppi isolati da animali. Più nel dettaglio, i sierotipi 1/2a (lineage II) e 1/2b e 4b (lineage I) sembrano essere responsabili della quasi totalità dei casi di listeriosi nell'uomo (Orsi *et al.*, 2011; Rawool *et al.*, 2016).

Le prime evidenze della presenza di *L. monocytogenes* risalgono al 1926, anno in cui questo batterio fu identificato come agente di malattia epizootica, causando la morte di un gruppo di conigli e porcellini d'India nel Regno Unito (Murray *et al.*, 1926). Solo molti anni più tardi, nel 1983, fu riportato il primo caso di focolaio di listeriosi nell'uomo direttamente correlato al consumo di alimenti contaminati nelle province marittime del Canada. Dopo questa prima evidenza di *L. monocytogenes* come agente patogeno di origine alimentare, si sono susseguiti negli anni casi di focolai legati al consumo di prodotti alimentari contaminati e questo ha portato alla necessità di approfondire la conoscenza di questo microrganismo, in modo tale da proteggere il più possibile il consumatore dal rischio di infezione (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

L. monocytogenes possiede alcune proprietà estremamente interessanti che ne favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione all'interno degli ambienti dell'industria alimentare e all'interno degli alimenti stessi. Il batterio, infatti, è un patogeno psicrotollerante, in grado

di crescere in presenza di un ampio intervallo di temperatura (-0.5-45°C) che comprende anche le temperature di refrigerazione, nonostante l'optimum di crescita sia compreso tra i 30 e i 37°C. Inoltre, esso è in grado di crescere e sopravvivere anche in presenza di un ampio intervallo di pH (compreso tra 4.7 e 9.3) e in presenza di elevate concentrazioni saline (10%, w/v). *L. monocytogenes* è anaerobio facoltativo, asporigeno, catalasi positivo, ossidasi-, urea- e indolo negativo. È mobile grazie alla presenza di flagelli peritrichi, ma solo a temperature comprese tra 24 e 28°C. Infine, come tutti i batteri appartenenti al genere *Listeria*, presenta una forma bastoncellare, con delle dimensioni pari a 0.5 x 1-1.5 µm (Ferreira *et al.*, 2014; Matle *et al.*, 2020).

La capacità di sopravvivere in presenza di condizioni ambientali estremamente variegata rende *L. monocytogenes* un batterio ubiquitario enormemente diffuso in natura. Esso, infatti, si ritrova in numerosi ambienti, sia rurali che urbani, e in particolare è stato isolato a partire da campioni d'acqua e suolo, all'interno di acque di scolo e nella vegetazione in decomposizione. Inoltre, *L. monocytogenes* può abitare il tratto gastrointestinale dell'uomo e di altri animali e può essere diffuso in natura anche attraverso le feci. Grazie alla sua estrema diffusione nell'ambiente questo patogeno riesce facilmente ad entrare all'interno della filiera di produzione degli alimenti. Qui, riesce a sopravvivere in corrispondenza di attrezzature e superfici di lavorazione grazie anche alla formazione di biofilm e cellule persistenti: questi contribuiscono a rendere i processi di sanificazione standard non sempre efficaci e ad aumentare il rischio di contaminazione degli alimenti stessi (Matereke & Okoh, 2020; Matle *et al.*, 2020).

1.2 Patogenesi e fattori di virulenza

Listeria monocytogenes è un batterio che presenta un'interessante capacità di adattamento. Esso, infatti, vive come saprofita nel suolo, ma è in grado di convertirsi in patogeno nel momento in cui entra all'interno delle cellule animali. Questo passaggio da saprofita a patogeno avviene grazie alla modulazione dell'espressione genica operata dalla proteina PrfA (Zhu *et al.*, 2017).

Come accennato nel paragrafo 1.1, si ritiene che la maggior parte delle infezioni causate da *L. monocytogenes* derivino dal consumo di alimenti contaminati. In seguito all'ingestione, il patogeno entra all'interno del corpo e riesce a raggiungere il tratto intestinale grazie alla sua capacità di sopravvivere nonostante la presenza di un ambiente altamente acido come quello dello stomaco e nonostante i tentativi di difesa dell'ospite (sali biliari nel duodeno, presenza

di infiammazioni non specifiche ed enzimi proteolitici) (Orsi *et al.*, 2011; Matle *et al.*, 2020). Se *L. monocytogenes* resta confinato all'interno dell'intestino, la patologia si manifesta nella sua forma più lieve attraverso sintomatologia gastroenterica. In altri casi, invece, dopo aver superato il primo tratto di intestino tenue, il patogeno riesce a aderire e ad attraversare l'epitelio intestinale, raggiungere la lamina propria e solo in seguito diffondersi rapidamente al fegato e alla milza attraverso il torrente circolatorio e linfatico (Radoshevich & Cossart, 2018). Arrivato al fegato, il suo primo organo target, *L. monocytogenes* inizia a moltiplicarsi e, grazie al passaggio diretto da epatocita a epatocita, riesce a determinare la formazione di focolai nel parenchima epatico. Durante le prime fasi dell'infezione si innesca una risposta immunitaria innata, grazie all'azione dei macrofagi che permettono di controllare la fase acuta distruggendo il patogeno. In un secondo momento, si innesca una risposta immunitaria acquisita mediata dai linfociti T, che aumenta la capacità di difesa dell'ospite nei confronti dell'infezione (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Le problematiche principali si riscontrano negli individui immunocompromessi. In questi casi, infatti, la proliferazione incontrollata del patogeno a livello del parenchima epatico può comportare il rilascio dello stesso a livello della circolazione sanguigna. Questo può portare a setticemia e all'insorgenza di infezioni secondarie in corrispondenza di altri distretti. In particolare, si osservano spesso infezioni fetali (nel caso delle donne in gravidanza) e infezioni del sistema nervoso centrale (*Figura 1*) (Orsi *et al.*, 2011).

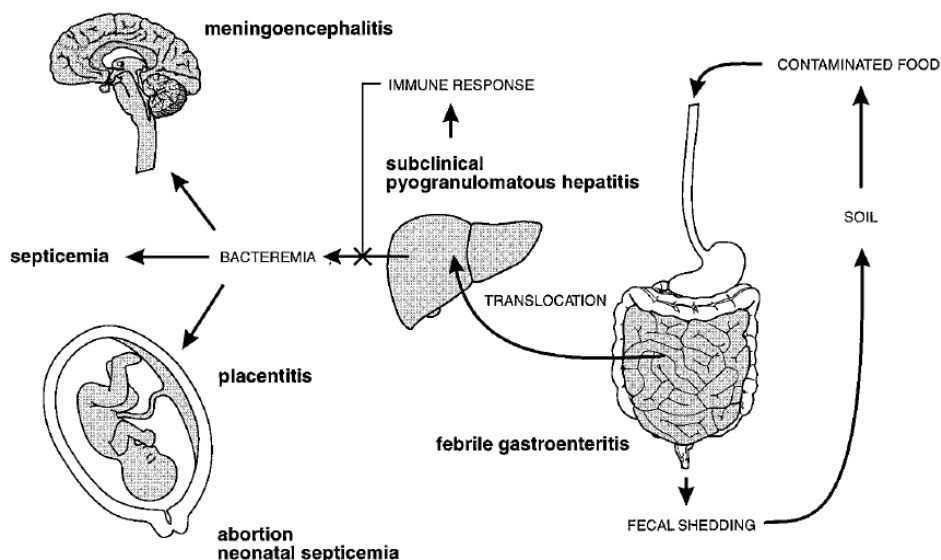


Figura 1. Rappresentazione schematica della patofisiologia dell'infezione di Listeria monocytogenes (Vazquez-Boland et al., 2001)

Più nel dettaglio, *L. monocytogenes* esercita la sua patogenicità nei riguardi dell'ospite attraverso un processo di infezione della cellula ben preciso, costituito da una serie di fasi sequenziali: adesione e invasione della cellula ospite, internalizzazione, lisi del vacuolo, moltiplicazione intracellulare e diffusione alle cellule adiacenti (Figura 2). Queste fasi di infezione sono rese possibili dall'azione di un ampio gruppo di fattori di virulenza espressi da *L. monocytogenes* (Matle *et al.*, 2020). In particolare, responsabile dell'adesione e internalizzazione del patogeno all'interno della cellula ospite è una famiglia di proteine di superficie, chiamate internaline.

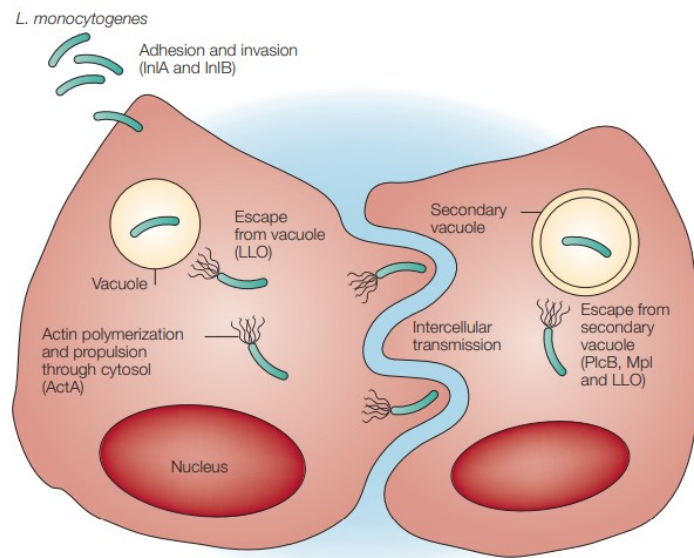


Figura 2. Rappresentazione del ciclo di infezione di *Listeria monocytogenes* (Pamer, 2004)

All'interno di questa famiglia, di maggior interesse sono InlA e InlB. InlA è in grado di interagire con E-caderina e promuove l'internalizzazione del batterio all'interno delle cellule epiteliali; al contrario, InlB interagisce con il recettore Met localizzato sulla membrana cellulare di epatociti, fibroblasti e cellule epitelioidi. Dopo essere stato internalizzato nella cellula ospite, *L. monocytogenes* viene confinato all'interno di un vacuolo a singola membrana, dal quale deve evadere per scatenare l'infezione. L'evasione è resa possibile dall'azione di due ulteriori fattori di virulenza molto importanti, ossia listeriolisina O (LLO) e fosfatidilinositolo-fosfolipasi C (PI-PLC). In particolare, queste proteine cooperano nella formazione di pori in corrispondenza della singola membrana del vacuolo. Grazie all'attività dei due fattori di virulenza in questione, *L. monocytogenes* viene rilasciata nel citosol dove può iniziare a crescere e replicarsi, sfruttando i nutrienti forniti dalla cellula ospite. In una fase successiva, grazie all'intervento di ActA, un ulteriore fattore di virulenza, il patogeno è in grado di diffondere alle cellule adiacenti. ActA è una proteina di superficie, che promuove

la polimerizzazione delle molecole di actina e la formazione di filamenti che spingono il patogeno verso la membrana plasmatica. A livello della membrana, *L. monocytogenes* viene confinato in una struttura simile ad un filopodio, che viene riconosciuta e inglobata dalla cellula adiacente, portando alla formazione di vacuoli secondari che presentano una doppia membrana. A questo punto, il patogeno deve evadere nuovamente da questo vacuolo per iniziare un nuovo ciclo di infezione. L'evasione è resa possibile dall'espressione di LLO, che partecipa ancora una volta alla formazione di pori sulla membrana del vacuolo, e dall'espressione della fosfolipasi plcB.

I geni che codificano per tutti i fattori di virulenza citati sono raggruppati all'interno di un cluster di 9.6 kb e la proteina PrfA controlla la loro espressione (Liu, 2006; Matle *et al.*, 2020; Pamer, 2004).

1.3 Listeriosi

La listeriosi, ossia l'infezione causata da *Listeria monocytogenes*, è una zoonosi determinata principalmente dal consumo di alimenti contaminati da questo patogeno. Oltre alla via alimentare, il contatto diretto con animali infetti e con ambienti contaminati sembra costituire una via alternativa e meno frequente di infezione (Matle *et al.*, 2020). Nonostante la listeriosi si manifesti raramente nella popolazione, questa malattia rimane di grande interesse e preoccupazione per le autorità sanitarie a causa del suo elevato tasso di mortalità e di ospedalizzazione. In particolare, secondo il rapporto annuale One Health dell'Unione Europea sulle zoonosi elaborato dall'EFSA (Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare) e dall'ECDC (Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie), nel 2020 è stato registrato un tasso di ospedalizzazione pari al 97.1% e un tasso di mortalità pari al 13%.

La listeriosi può essere distinta in due forme principali, ossia la listeriosi perinatale e la listeriosi nei pazienti adulti (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Per quanto riguarda la forma perinatale, ci si concentra in particolare sull'infezione durante il periodo della gravidanza. Questa spesso si manifesta attraverso sintomi non specifici e simil-influenzali, come febbre, mialgia e diarrea. Nonostante la sintomatologia piuttosto lieve, l'infezione può estendersi al feto per trasmissione ematogena transplacentare e può causare parto prematuro, aborto, infezione e morte neonatale, polmoniti e meningiti (<https://www.iss.it/listeriosi-perinatale>). Nell'adulto, a sua volta, la listeriosi può assumere due ulteriori forme, ossia la forma diarroica o non-invasiva e la forma invasiva o sistemica. Presentano un maggior rischio di sviluppare listeriosi invasiva le persone anziane, malate di tumori maligni, coloro che soffrono

di diabete mellito, malattie epatiche, renali e autoimmuni e più in generale tutti gli individui immunocompromessi (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). In questa forma di listeriosi, il patogeno si diffonde in maniera sistemica nell'organismo attraverso il flusso sanguigno fino al sistema nervoso centrale e l'infezione si manifesta principalmente attraverso meningite, encefalite e setticemia (Matle *et al.*, 2020). Mediamente il tempo di incubazione che intercorre tra l'ingestione dell'alimento contaminato e la manifestazione dei sintomi è di circa tre settimane, ma può prolungarsi anche fino a 70 giorni.

Per quanto riguarda la listeriosi non-invasiva, questa si manifesta principalmente negli individui in buona salute attraverso una sintomatologia gastrointestinale autolimitante tipica delle tossinfezioni alimentari, febbre, e cefalea. Solitamente i sintomi compaiono dopo poche ore dall'ingestione di alimenti contaminati (<https://www.epicentro.iss.it/listeria/>).

In generale, si stima che la dose minima che deve essere ingerita per provocare l'infezione si aggiri attorno a 10^6 UFC (Unità Formanti Colonia) per grammo di alimento. Per le categorie più a rischio, però, la dose si abbassa attorno a 10^2 - 10^4 UFC/g. Si tratta comunque di cifre indicative, che possono variare anche di molto a seconda della virulenza del ceppo di *L. monocytogenes* e delle condizioni di salute dell'individuo ospite (Buchanan *et al.*, 2017).

1.4 *Listeria monocytogenes* negli alimenti

Listeria monocytogenes è un microrganismo ubiquitario, che possiamo ritrovare all'interno di ambienti estremamente variegati. Questo patogeno può essere isolato dalle acque e dal suolo, ma è soprattutto un importante contaminante di molti alimenti. Questi, infatti, possono costituire un terreno favorevole per la sua crescita e risultare responsabili di numerosi casi di tossinfezione. In particolare, nel 2020 sono stati segnalati 16 focolai di origine alimentare all'interno di sette Stati Membri dell'Unione Europea causati dal consumo di alimenti contaminati da *L. monocytogenes*. All'interno di questi focolai sono stati identificati in totale 120 casi di infezione, che hanno portato a 83 ospedalizzazioni e 17 decessi. Per alcuni di questi focolai è stata identificata con certezza la matrice alimentare responsabile: gli alimenti maggiormente coinvolti sono stati pesce e prodotto ittico, formaggi, carne e altri prodotti derivati (*Figura 3*) (EFSA & ECDC, 2021).

Più in generale, gli alimenti che risultano solitamente essere maggiormente associati all'infezione da *L. monocytogenes* sono: pesce e frutti di mare, prodotti a base di carne, frutta e verdura cruda, latte non pastorizzato e latticini e cibi pronti all'uso o ready-to-eat (RTE) (<https://www.epicentro.iss.it/listeria/>).

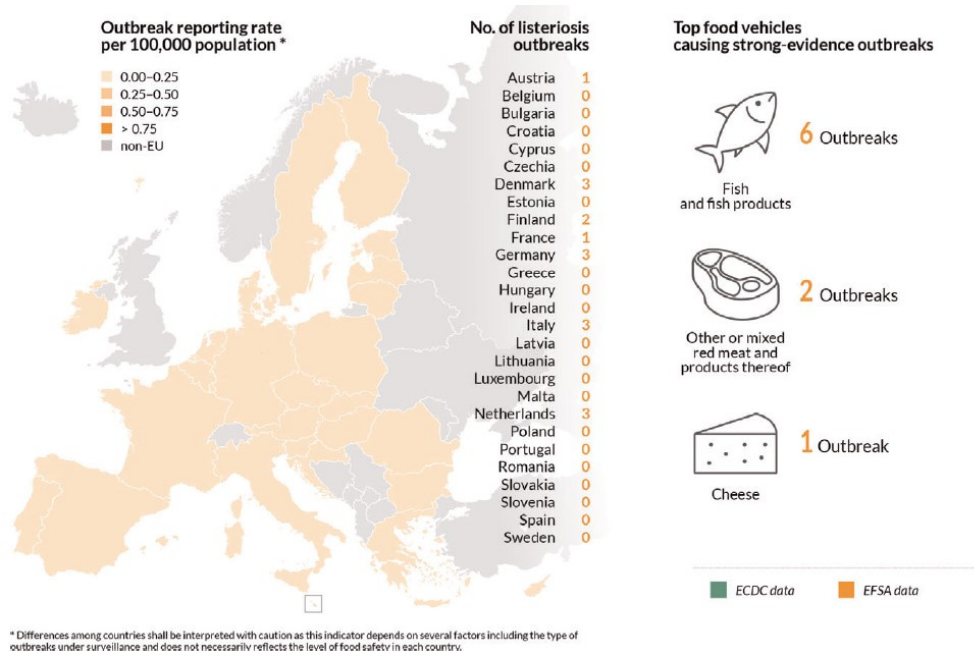


Figura 3. Diffusione dei focolai di listeriosi nell'Unione Europea nel 2020 e principali veicoli alimentari coinvolti (EFSA & ECDC, 2021)

Di particolare preoccupazione sono gli alimenti RTE. Questi sono definiti come “prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento termico per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti” (Reg. CE 2073/2005, Articolo 2). *L. monocytogenes* normalmente viene inattivata in seguito ad un trattamento termico, quindi questi prodotti, non essendo necessariamente sottoposti ad una fase di cottura prima del consumo, possono rappresentare un fattore di rischio notevole per la salute del consumatore (Ziegler *et al.*, 2019). All'interno di questa categoria di alimenti possono rientrare anche frutta e verdura, prodotti che possono essere consumati crudi. Come accennato nel paragrafo 1.1, *L. monocytogenes* può risiedere nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali, quindi può essere diffuso facilmente nell'ambiente attraverso le feci. Il materiale fecale può contaminare le acque e i terreni utilizzati per la coltivazione dei prodotti freschi, che a loro volta vengono a contatto con il patogeno. Questi prodotti possono essere consumati dall'uomo con il rischio di scatenare un'infezione (Zhu *et al.*, 2017). Oltre all'uomo, anche gli animali possono entrare in contatto con il patogeno e infettarsi. Diversi studi hanno associato la comparsa di listeriosi negli animali al consumo di insilati contaminati, ma anche al contatto con polveri provenienti dal suolo contaminato. L'animale infetto può quindi contribuire alla trasmissione del patogeno all'uomo attraverso la catena di produzione della carne (Matle *et al.*, 2020). Oltre alla carne, le vacche da latte infette possono rilasciare il patogeno all'interno del latte o, in al-

ternativa, questo può essere presente nell'ambiente e contaminare il latte durante la fase di mungitura. Inoltre, la presenza di *L. monocytogenes* nel latte crudo o all'interno dell'ambiente di caseificazione può portare alla contaminazione dei formaggi o di altri prodotti lattiero-caseari. Particolarmente a rischio sono i formaggi a latte crudo, mentre la pastorizzazione sembra eliminare in maniera efficace il patogeno (Ryser, 2021).

La contaminazione della materia prima può rappresentare un fattore di rischio importante anche per la contaminazione delle superfici sulle quali questi prodotti vengono poi lavorati. Oltre che dalla materia prima, il patogeno può essere trasportato all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti e nei negozi di vendita al dettaglio anche dal personale stesso. La presenza di *L. monocytogenes* è stata segnalata all'interno di molteplici industrie alimentari, in corrispondenza di pavimenti, banconi, apparecchiature e superfici di vario genere e all'interno di frigoriferi e congelatori (Melo *et al.*, 2015). Una volta entrato negli ambienti di lavorazione degli alimenti, il patogeno può sopravvivere per lunghi periodi di tempo in un ambiente piuttosto ostile grazie alle sue capacità di tollerare vari stress (come la mancanza di nutrienti), condizioni estremamente varie di temperatura, pH e attività dell'acqua e grazie alla capacità di formare biofilm. Se non vengono adottate delle misure per controllare la sua presenza all'interno degli ambienti di lavorazione degli alimenti, come l'attuazione di buone pratiche di pulizia e disinfezione, *L. monocytogenes* può persistere e contribuire in modo importante alla cross-contaminazione dei prodotti (Ferreira *et al.*, 2014; Jordan *et al.*, 2018). Uno dei primi casi di tossinfezione da *L. monocytogenes* chiaramente causato dalla contaminazione degli ambienti di lavorazione è stato segnalato nel 1998 all'interno di un impianto per la produzione di prodotti a base di carne e ha causato 108 infezioni e 14 decessi, portando l'attenzione sull'importanza della pulizia delle attrezzature (Beliaz *et al.*, 2022).

Da un punto di vista normativo, per salvaguardare l'igiene pubblica e la salute del consumatore, sono stati introdotti una serie di Regolamenti Comunitari a livello di Unione Europea che hanno lo scopo di fornire all'Operatore del Settore Alimentare (OSA) i principali criteri per la gestione del processo produttivo. In particolare, il Regolamento CE 2073/2005 si occupa di stabilire i criteri microbiologici da applicare ai prodotti alimentari, dividendoli in criteri di sicurezza alimentare e criteri di igiene di processo. L'OSA è responsabile della produzione e distribuzione dei propri prodotti e al fine di garantire la sicurezza di questi alimenti applica delle procedure di prevenzione che permettono di ridurre eventuali possibilità di contaminazione. Queste si basano sulla valutazione del rischio basata sui principi dell'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) e sulla verifica dell'efficacia delle procedure attraverso l'attuazione di piani di campionamento.

Il Regolamento CE 2073/2005 stabilisce i criteri di sicurezza alimentare per *L. monocytogenes* e, in particolare, si concentra sulla categoria degli alimenti pronti all'uso o ready-to-eat. Questi alimenti vengono suddivisi in tre categorie principali:

- Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita del patogeno;
- Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita del patogeno;
- Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali.

Secondo il Regolamento in questione, rientrano all'interno della categoria degli alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* tutti i prodotti con $pH \leq 4.4$ o $a_w \leq 0.92$, i prodotti con $pH \leq 5.0$ e $a_w \leq 0.94$ e i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a cinque giorni.

Secondo la normativa, nel caso degli alimenti che costituiscono terreno favorevole per lo sviluppo del patogeno, questo deve essere assente in 25 g all'interno di 5 unità campionarie. Nel momento in cui il produttore è in grado di dimostrare che il prodotto non supererà il limite di 100 UFC/g durante tutto il suo periodo di conservabilità, allora può essere imposto il limite di 100 UFC/g all'interno di 5 unità campionarie. Anche nel caso degli alimenti che non costituiscono un terreno favorevole per lo sviluppo di *L. monocytogenes* il limite stabilito è di 100 UFC/g all'interno di 5 unità campionarie. Infine, nel caso degli alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali, il patogeno deve essere assente in 25 g all'interno di 10 unità campionarie (Tabella 1) (Reg. CE 2073/2005).

| Categoria alimentare | Piano di campionamento | | Limiti | Fase a cui si applica il criterio |
|--|------------------------|---|----------------------|---|
| | n | c | | |
| Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali | 10 | 0 | Non rilevata in 25 g | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali | 5 | 0 | 100 UFC/g | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| | 5 | 0 | Non rilevata in 25 g | Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'OSA che li produce |

| | | | | |
|--|---|---|-----------|--|
| Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali | 5 | 0 | 100 UFC/g | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
|--|---|---|-----------|--|

Tabella 1. Criteri di sicurezza alimentare per *Listeria monocytogenes* (Reg. CE 2073/2005).

Vista la capacità di *L. monocytogenes* di sopravvivere e colonizzare gli ambienti di lavorazione degli alimenti, il Regolamento CE 2073/2005 prevede anche la ricerca di questo patogeno all'interno degli impianti in determinati contesti. In particolare, “gli operatori del settore alimentare che producono alimenti pronti, i quali possono sviluppare *L. monocytogenes* e presentare pertanto un rischio per la salute pubblica, procedono nell'ambito del loro piano di campionamento al prelievo di campioni dalle aree di lavorazione e della attrezzature per la ricerca di *L. monocytogenes*” (Reg. CE 2073/2005, Articolo 5). Per la ricerca del patogeno sulle superfici, il Reg. CE 2073/2005 fa riferimento alle operazioni di campionamento descritte nella norma ISO 18593.

I focolai di listeriosi sono sempre attuali. Nell'estate del 2022, infatti, in diverse Regioni italiane è stato osservato un aumento dei casi di listeriosi alimentare, dovuta al consumo di alimenti contaminati da *L. monocytogenes*. In particolare, a partire dal 2017 sono stati segnalati 71 casi di listeriosi invasiva e 3 decessi accomunati dallo stesso agente causale, ossia il ceppo di *L. monocytogenes* ST155. La maggior parte dei casi correlati al focolaio (51) sono stati segnalati nei mesi di maggio-agosto 2022 in dieci Regioni italiane. L'età media dei pazienti coinvolti è stata 75 anni e la maggior parte di loro era precedentemente affetto da altre patologie. Nel mese di settembre il Ministero della Salute ha pubblicato sul Sistema di Allerta Rapido per Alimenti e Mangimi (RASFF) una notifica che indica come possibile causa del focolaio il consumo di würstel di pollo contaminati. In particolare, le verifiche effettuate dal Ministero hanno evidenziato la presenza del ceppo ST155 all'interno dei würstel di pollo prodotti dalla ditta veneta Agricola Tre Valli, in seguito a campionamenti eseguiti sia in ambito domestico che presso lo stabilimento stesso. Verso la fine di settembre, a scopi precauzionali, la ditta in questione ha annunciato il ritiro di alcuni prodotti ed ha messo in atto una comunicazione rafforzativa di quanto già indicato in etichetta riguardo le corrette modalità di consumo del prodotto. Infatti, nonostante i würstel siano prodotti cotti a base di

carne, possono subire contaminazione durante le fasi successive, come ad esempio la spelatura e il confezionamento. Proprio a causa di questo effettivo rischio, il produttore raccomanda in etichetta un'adeguata cottura. Questa, però, spesso non viene eseguita, portando a notevoli rischi per la salute, soprattutto per le persone fragili. Oltre all'adeguata cottura il Ministero della Salute consiglia anche un lavaggio frequente delle mani e delle superfici di lavoro e raccomanda di conservare gli alimenti in frigorifero nei tempi e nelle modalità riportate in etichetta.

Al momento sono ancora in corso ulteriori indagini su altre matrici alimentari che potrebbero aver causato il focolaio in questione (https://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=6004; <https://ilfattoalimentare.it/wurstel-mangiati-crudi-6-morti-allerta-supermercati-wudy-aia.html>).

2. Persistenza dei batteri in risposta agli stress

I batteri vivono all'interno di ambienti sottoposti a continui cambiamenti e questo ha consentito loro di sviluppare nel corso dell'evoluzione una delle loro più importanti caratteristiche, ossia la capacità di sopravvivere adattandosi rapidamente. Uno dei metodi di adattamento più interessanti è sicuramente la capacità di entrare in uno stato di dormienza, caratterizzato da una bassa attività metabolica e da una crescita nulla o molto ridotta. Solitamente, nel momento in cui le condizioni ambientali tornano permissive, si osserva una ripresa della crescita e della divisione cellulare così come dell'attività metabolica. Nello specifico, nell'ambito di questa tesi, di particolare interesse sono due fenomeni di dormienza: la persistenza batterica e lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC) (Ayrapetyan *et al.*, 2018).

2.1 Persistenza batterica

La condizione di persistenza batterica è stata descritta per la prima volta in ambito clinico in seguito alla scoperta e all'utilizzo degli antibiotici. Il termine "cellule persistenti" fu introdotto nel 1944 da Joseph Bigger, che definì in questo modo delle cellule di *Staphylococcus aureus* appartenenti ad una popolazione suscettibile alla penicillina che erano sopravvissute ad un trattamento con l'antibiotico. Queste cellule, una volta terminato il trattamento, erano in grado di originare una popolazione nuovamente sensibile all'antibiotico, ma che conteneva una frazione di cellule tolleranti al trattamento (Van den Bergh *et al.*, 2017). In particolare, si definiscono *bacterial persisters* (batteri persistenti) tutte quelle cellule che costituiscono una sottopopolazione con crescita lenta o assente tollerante al trattamento antibiotico o a stress di altro tipo all'interno di una popolazione suscettibile (Fisher *et al.*, 2017). Il concetto di "batteri persistenti" non deve essere confuso con il concetto di "resistenza". La resistenza è una delle strategie che viene più facilmente osservata quando si ha a che fare con un trattamento antibiotico e consiste in una modificazione genetica acquisita che consente ad una popolazione di batteri di crescere in presenza di un antibiotico (Van den Bergh *et al.*, 2017; Fisher *et al.*, 2017). Quindi, al contrario dei batteri resistenti, i persistenti sono delle varianti fenotipiche transitorie geneticamente identiche a cellule suscettibili all'interno di una popolazione clonale, che sviluppano un fenotipo tollerante a trattamenti transienti di antibiotici. Se le cellule resistenti sono in grado di proliferare e originare altre cellule resistenti in presenza del trattamento antibiotico, al contrario le cellule persistenti non proliferano (o proliferano molto poco) in condizioni di stress, ma solo in seguito alla rimozione del

trattamento danno origine ad una popolazione sensibile con una piccola porzione di cellule persistenti (Maisonneuve & Gerdes, 2014).

Per quanto riguarda la formazione di queste cellule persistenti, tradizionalmente si pensava che queste si originassero in maniera stocastica all'interno di una popolazione batterica. Studi successivi più approfonditi, però, hanno dimostrato che questo stato di persistenza può essere anche indotto attraverso l'esposizione a condizioni particolarmente stressanti, che non si limitano al trattamento antibiotico, ma si estendono anche allo stress da carenza di nutrienti, stress ossidativo, presenza di un pH non ottimale e biofilm. Inoltre, è stato osservato che anche la fase stazionaria sembra indurre la formazione di cellule persistenti, infatti in questa fase si registrano livelli di *persisters* più elevati rispetto alle colture in fase logaritmica (Harms *et al.*, 2016; Ayrapetyan *et al.*, 2018).

La presenza di cellule persistenti all'interno di una popolazione batterica può essere facilmente rilevata osservando il fenomeno della curva di inattivazione bifasica (Figura 4).

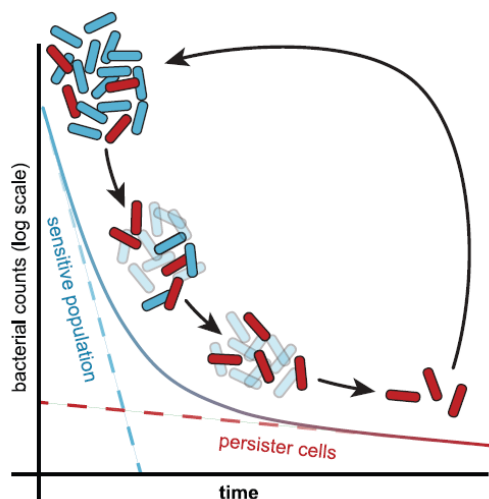


Figura 4. Curva di inattivazione bifasica di una popolazione batterica in seguito all'esposizione ad uno stress (Harms *et al.*, 2016)

Nel momento in cui una coltura batterica in fase di crescita logaritmica viene esposta ad una condizione di stress di vario tipo, è possibile osservare in un primo momento una fase di rapido calo della conta batterica che rivela la suscettibilità della maggior parte della popolazione. In un secondo momento, invece, si osserva una cinetica di uccisione molto più lenta, che rivela la presenza di una sottopopolazione di cellule persistenti tolleranti allo stress, che vanno più difficilmente incontro a morte. In seguito alla rimozione dello stress, le cellule persistenti riprendono la loro crescita, originando una progenie geneticamente identica ma suscettibile (Maisonneuve & Gerdes, 2014; Harms *et al.*, 2016).

2.2 Persistenza di *Listeria monocytogenes* e possibili meccanismi molecolari

Quanto visto finora riguardo la persistenza interessa anche *Listeria monocytogenes*.

In particolare, come già accennato in precedenza, *L. monocytogenes* è un patogeno che possiamo ritrovare all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti e si pensa che proprio la sua presenza in questi contesti sia la principale fonte di cross-contaminazione degli alimenti stessi. Questa situazione già di per sé preoccupante è aggravata ulteriormente dal fatto che alcuni ceppi di questo patogeno possono persistere all'interno di questi luoghi per lunghi periodi (in alcuni casi addirittura anni), anche a causa di trattamenti di pulizia e disinfezione poco efficaci (Buchanan *et al.*, 2017). In generale, i ceppi di *L. monocytogenes* sono definiti persistenti nel momento in cui vengono isolati ripetutamente nel tempo all'interno di uno stesso ambiente o nicchia ecologica (Osek *et al.*, 2022).

Sono noti vari esempi di persistenza all'interno di impianti di lavorazione degli alimenti. Interessante è lo studio di Sauders *et al.* (2009) che si concentra sugli ambienti della vendita al dettaglio. In particolare, nello studio sono stati presi in considerazione 121 negozi di vendita al dettaglio e in 73 (60%) è stata riscontrata la presenza di *L. monocytogenes*. Inoltre, in 5 su 7 stabilimenti in cui è stato eseguito un monitoraggio dopo 8-19 mesi dal campionamento iniziale è stata rinvenuta nuovamente la presenza degli stessi ceppi di *L. monocytogenes*, supportando l'ipotesi della persistenza di questo batterio all'interno degli ambienti della vendita al dettaglio.

La persistenza di *L. monocytogenes* all'interno degli spazi dell'industria alimentare può essere dovuta a vari fattori. In primo luogo, questo batterio potrebbe sopravvivere all'interno di particolari nicchie difficili da raggiungere e quindi da pulire e disinfettare, come crepe e fessure sulle superfici. In questo caso, la sopravvivenza nel tempo potrebbe essere dovuta alla formazione di biofilm (che verrà discussa più approfonditamente nel paragrafo seguente) o all'attivazione di una serie di meccanismi fisiologici di adattamento a stress ambientali (Buchanan *et al.*, 2017). Ad esempio, in presenza di stress da basse temperature, *L. monocytogenes* attiva una serie di risposte. In primo luogo, attiva l'espressione delle *cold shock proteins* (CSPs), piccole proteine che si comportano da chaperon molecolari e consentono la trascrizione, traduzione e ripiegamento delle proteine anche in presenza di stress da freddo. Inoltre, aumenta la produzione di soluti intracellulari, quali glicina betaina e carnitina, che agiscono da crioprotettori. Infine, il batterio agisce a livello di membrana cellulare, aumentando la concentrazione di acidi grassi insaturi che favoriscono un irrigidimento della stessa e impediscono la fuoriuscita di contenuto citoplasmatico (Materike & Okoh, 2020).

Un altro fattore che potrebbe contribuire alla persistenza di *L. monocytogenes* all'interno di ambienti di produzione degli alimenti è la formazione vera e propria di *persisters*. Sembra che questi vadano incontro ad un cambiamento di morfologia da bacilli a cocci e consentano al patogeno di mantenersi vitale per lungo tempo anche in presenza di condizioni ambientali avverse (Buchanan *et al.*, 2017).

Nonostante i meccanismi molecolari che stanno alla base della transizione morfologica e fisiologica a *persisters* non siano ancora ben noti a causa delle caratteristiche di eterogeneità e numerosità di queste cellule, sono state comunque avanzate delle ipotesi. Le osservazioni in questione riguardano principalmente popolazioni di *Escherichia coli*, ma sembra siano valide anche per *L. monocytogenes*.

In particolare, come accennato nel paragrafo 2.1, è stato osservato che la formazione di cellule persistenti può essere stocastica o indotta da una serie di condizioni ambientali, quali la mancanza di nutrienti o l'esposizione ad antibiotici (Harms *et al.*, 2016).

La formazione stocastica di cellule persistenti all'interno di una popolazione batterica viene vista come una strategia di tipo *bet-hedging*. Questa strategia di evoluzione si basa sulla presenza di una certa eterogeneità fenotipica all'interno di una popolazione batterica isogonica, in modo tale da ottimizzarne la fitness all'interno di un ambiente in continuo cambiamento. Oltre a questo, le popolazioni batteriche possono rispondere ai cambiamenti ambientali, andando a modulare in maniera sia qualitativa che quantitativa la velocità di conversione fenotipica a cellule persistenti. In entrambi i casi, la formazione di cellule persistenti sembra essere controllata dagli stessi *pathways* (Harms *et al.*, 2016; Van den Bergh *et al.*, 2017).

Tra i meccanismi molecolari che controllano la formazione di batteri persistenti troviamo la risposta stringente. Attraverso la risposta stringente le cellule sono in grado di rilevare la carenza di aminoacidi nell'ambiente e rispondono mediante un rallentamento della crescita batterica e un aumento della sintesi di aminoacidi. Ciò che rende possibile questa risposta è la produzione dell'effettore molecolare (p)ppGpp (guanosina tetrafosfato e pentafosfato) o "alarmone", che è in grado di inibire i processi cellulari che consumano il maggior numero di risorse nutritive, come la divisione cellulare, la trascrizione e la traduzione (Maisonneuve & Gerdes, 2014; Ayrapetyan *et al.*, 2018). L'alarmone (p)ppGpp viene sintetizzato grazie all'azione di due enzimi (RelA e SpoT) e agisce sull'espressione genica andando a legare l'RNA polimerasi e ad aumentare la trascrizione di geni utili al processo biosintetico degli aminoacidi (Harms *et al.*, 2016). (p)ppGpp è anche in grado di favorire l'accumulo di RpoS, il principale regolatore della risposta generale allo stress, che agisce attraverso una riprogrammazione trascrizionale della cellula. È stato osservato che questa risposta generale allo

stress può essere indotta dall'entrata in fase stazionaria o, più in generale, dalla presenza di stress termico, ossidativo, stress da carenza di nutrienti, pH estremo e molti altri segnali. RpoS è in grado di migliorare la tolleranza allo stress da parte della popolazione e di stimolare la formazione di batteri persistenti (Harms *et al.*, 2016; Maisonneuve & Gerdes, 2014). L'accumulo di alarmoni (p)ppGpp, in aggiunta, è in grado di inibire l'attività dell'enzima esopolifosfatasi (PPX), che in condizioni normali si occupa della degradazione dei polifosfati. Con l'inibizione di PPX e la normale attività della polifosfato chinasi PPK, si genera un accumulo di polifosfati che porta a sua volta all'attivazione di un processo proteolitico mediato dall'attivazione della proteasi Lon, indispensabile per l'induzione della persistenza attraverso il sistema tossina-antitossina (Ayrapetyan *et al.*, 2018).

I sistemi tossina-antitossina (TA) sono moduli genetici generalmente costituiti da due geni: il primo codifica per una tossina stabile di natura proteica, mentre il secondo codifica per un'antitossina instabile (che può essere una proteina o un'RNA). Esistono cinque tipologie di sistemi TA, identificati in base alla loro architettura genetica e in base alla natura della regolazione data dall'attività dei moduli TA. In particolare, nell'ambito della persistenza, di maggior interesse è il sistema TA di tipo II (Van den Bergh *et al.*, 2017; Maisonneuve & Gerdes, 2014). La tossina è in grado di inibire la crescita batterica andando ad interferire con i processi cellulari essenziali, mentre l'antitossina compromette la funzionalità della tossina andandola a legare e reprime contemporaneamente l'espressione dell'operone TA (Harms *et al.*, 2016). In presenza di stress ambientali di vario tipo o in seguito ad attivazioni stocastiche della via di segnalazione di (p)ppGpp, si arriva all'attivazione della proteasi Lon. Questa sembra agire andando a degradare l'antitossina e distruggendo il normale rapporto tossina-antitossina presente nella cellula. La tossina, quindi, è libera di esercitare i propri effetti a valle, andando ad inibire crescita e divisione cellulare, e favorire l'entrata della cellula in uno stato di dormienza tipico della persistenza (Ayrapetyan *et al.*, 2018).

Il meccanismo appena descritto regolato dall'alarmoni (p)ppGpp è riassunto nella *Figura 5*.

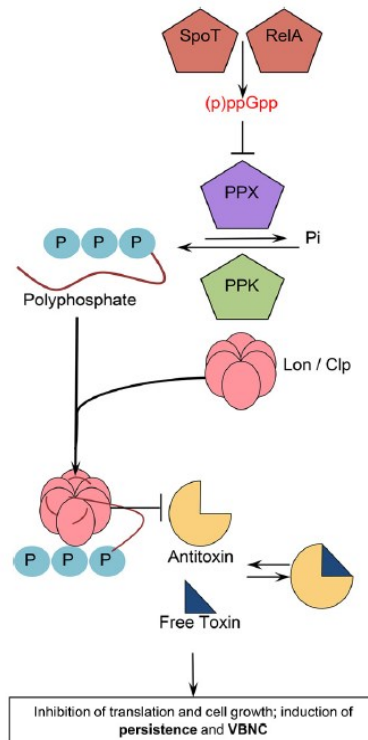


Figura 5. Meccanismo di formazione delle cellule persistenti regolato dall'alarmone (p)ppGpp (Ayrapetyan *et al.*, 2018)

Recentemente alcuni studi hanno evidenziato il fatto che i sistemi TA siano importanti nel favorire la persistenza batterica, ma non lo siano in maniera così significativa nei batteri gram-positivi. Pare, infatti, che la formazione di aggregati proteici all'interno di queste cellule rivesta un ruolo importante nell'induzione dello stato di persistenza: in particolare, la profondità di dormienza sembra essere direttamente proporzionale al livello di aggregazione proteica intracellulare. Inoltre, la formazione di questi aggregati è promossa dalla diminuzione dei livelli di ATP della cellula (Ayrapetyan *et al.*, 2018).

Oltre alla risposta stringente e alle ulteriori risposte indotte dall'alarmone (p)ppGpp, anche l'attivazione della risposta SOS sembra essere associata alla persistenza batterica. Il regulone SOS è costituito principalmente da geni responsabili della riparazione del DNA e viene indotto proprio in risposta ad un danno al DNA. Questo danno può essere dovuto ad un casuale malfunzionamento delle cellule o, in alternativa, da svariate condizioni di stress (pH estremo, stress ossidativo, trattamento antibiotico, blocco della replicazione del DNA). È stato osservato che la risposta SOS svolge un duplice ruolo nella persistenza batterica: innanzitutto agisce come pathway complementare in risposta allo stress e induce la formazione di persistenti; in secondo luogo, sembra fornire vie di riparazione del DNA importanti nella ripresa delle cellule persistenti una volta cessato lo stress (Maisonneuve & Gerdes, 2014; Harms *et al.*, 2016).

2.3 Biofilm

Tra le motivazioni che spiegano la persistenza di *Listeria monocytogenes* all'interno degli impianti di produzione degli alimenti potrebbe rientrare anche la capacità di questo patogeno di formare biofilm. È stato osservato che *L. monocytogenes* è in grado di aderire ad un'ampia tipologia di materiali, tra cui acciaio inossidabile, ghisa, gomma nitrilica, nylon, teflon, poliestere e vetro, tutti materiali che si ritrovano facilmente negli ambienti di lavorazione degli alimenti (Ferreira *et al.*, 2014). Il biofilm è costituito da una matrice extracellulare auto-prodotta, formata a sua volta da DNA extracellulare, proteine, polisaccaridi (tra cui l'acido teicoico) e altre molecole di natura inorganica, all'interno della quale sono intrappolate le cellule batteriche, che risultano adese tra loro e alla superficie (Osek *et al.*, 2022). La capacità di *L. monocytogenes* di formare biofilm conferisce a questo patogeno una serie di vantaggi che gli consentono di sopravvivere all'interno di ambienti inospitali. La matrice extracellulare all'interno della quale le cellule batteriche sono intrappolate, infatti, contribuisce alla protezione di queste dall'ambiente esterno (da essiccazione, raggi UV e trattamenti antimicrobici), favorisce la cooperazione metabolica tra cellule attraverso lo scambio di nutrienti e la rimozione di metaboliti tossici e stimola l'acquisizione di tratti genetici interessanti (come i geni dell'antibiotico-resistenza) tramite trasferimento genico orizzontale (Ferreira *et al.*, 2014).

In generale, nonostante la capacità di formare biofilm sembri favorire la persistenza di *L. monocytogenes* all'interno degli ambienti di produzione degli alimenti, non è ancora ben chiaro se i ceppi persistenti (quindi i ceppi che sono stati isolati ripetutamente all'interno di un determinato ambiente o di una determinata matrice alimentare) presentino effettivamente una miglior capacità di formare biofilm. Gli studi a riguardo, infatti, mostrano risultati molto contrastanti, probabilmente a causa dei diversi metodi sperimentali utilizzati e della difficoltà di riprodurre le condizioni di un sistema *in vivo* (Ferreira, *et al.* 2014; Gupta & Adhikari, 2022). Ad esempio, nello studio di Borucki *et al.* (2003) è stata testata la capacità di formare biofilm su una superficie di PVC di 26 ceppi di *L. monocytogenes* isolati all'interno di un caseificio nei serbatoi per il latte. 11 di questi ceppi erano persistenti all'interno dei serbatoi, mentre 15 erano stati isolati solo sporadicamente. In seguito ad un saggio su piastra per microtitolazione attraverso la colorazione con *crystal violet*, è emerso che i ceppi persistenti erano in grado di formare biofilm in modo decisamente migliore rispetto ai ceppi isolati solo sporadicamente. Al contrario, nello studio di Djordjevic *et al.* (2002), utilizzando la stessa tipologia di saggio e lo stesso materiale di adesione, non è stata osservata alcuna differenza significativa nella formazione di biofilm tra 5 ceppi di *L. monocytogenes* persistenti e 5 ceppi

di *L. monocytogenes* isolati sporadicamente all'interno di un impianto di lavorazione del pesce. Riguardo il rapporto tra cellule persistenti e capacità di formare biofilm, quindi, è sicuramente ancora necessaria una ricerca più approfondita.

Nonostante queste questioni ancora da risolvere, ugualmente la presenza di biofilm di *L. monocytogenes* all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti costituisce un fattore di preoccupazione rilevante per la sicurezza alimentare e aumenta ulteriormente il rischio di cross-contaminazione dei prodotti alimentari (Ferreira *et al.*, 2014).

2.4 Cellule vitali ma non coltivabili (VBNC)

Oltre alla condizione di persistenza, le cellule di una popolazione batterica possono entrare in un ulteriore stato di dormienza, chiamato *Viable but Nonculturable State* (stato vitale ma non coltivabile o VBNC). In particolare, le cellule che si trovano in uno stato VBNC costituiscono una sottopopolazione batterica che ha perso in modo transiente la sua capacità di crescere su terreni comunemente utilizzati in laboratorio su cui in precedenza era in grado di crescere. Queste cellule continuano a presentare integrità di membrana e mostrano una riduzione dell'attività metabolica (si riduce la sintesi di ATP, l'espressione genica e l'espressione dell'mRNA); ciò nonostante, l'entrata nello stato VBNC permette alle popolazioni batteriche di mantenersi in vita per tempi più o meno prolungati (in alcuni casi oltre l'anno) anche in presenza di condizioni ambientali ostili, riuscendo a passare inosservate durante la loro ricerca attraverso metodi colturali (Widemann *et al.*, 2021; Ayrapetyan *et al.*, 2018).

Lo stato VBNC è stato osservato sperimentalmente per la prima volta nel 1982 all'interno di popolazioni di *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*: queste, quando messe in sospensione all'interno di una soluzione di acqua di mare artificiale, perdevano rapidamente la loro capacità di crescere in terreni colturali solitamente adatti alla loro crescita, ma rimanevano ugualmente vitali (Besnard, Federighi, & Cappelier, 2000).

Come visto nel caso dei *bacterial persisters*, anche la formazione di cellule VBNC sembra essere un metodo di sopravvivenza indotto in seguito all'esposizione a particolari condizioni stressanti. In particolare, queste condizioni includono l'esposizione a temperature molto basse o elevate, assenza o carenza di nutrienti, variazioni di pH e salinità e trattamenti antibiotici (Ayrapetyan *et al.*, 2018; Afari & Hung, 2018). In aggiunta, alcuni studi più recenti hanno osservato la presenza di popolazioni di cellule VBNC anche in corrispondenza di ambienti non apparentemente stressanti, suggerendo che questo stato potrebbe originarsi anche in modo stocastico. Sembra, quindi, che sia i *bacterial persisters* che le cellule VBNC si formino

in maniera analoga, ossia in parte in maniera stocastica e in parte in presenza di condizioni stressanti simili. Inoltre, nonostante le conoscenze a riguardo siano ancora limitate, sembra che anche i meccanismi molecolari alla base della formazione di questi due stati di dormienza siano gli stessi, portando a pensare che lo stato VBNC sia semplicemente uno stato di dormienza più profondo rispetto alla persistenza (Ayrapetyan *et al.*, 2018).

È stato dimostrato che più di 100 specie di microrganismi, inclusi batteri e funghi, sono in grado di entrare in uno stato VBNC quando esposti a stress ambientali di vario tipo. Tra questi rientra anche *Listeria monocytogenes* (Dong *et al.*, 2019). In particolare, le cellule vitali di *L. monocytogenes* che possono essere presenti all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti sono continuamente esposte a condizioni di stress, date soprattutto dalle frequenti operazioni di pulizia e disinfezione, dalle variazioni di temperatura, di pH e di salinità e dalla carenza di nutrienti disponibili. Proprio la mancanza di nutrienti provoca una serie di cambiamenti morfologici e fisiologici in *L. monocytogenes*, come la riduzione dell'attività metabolica e della dimensione cellulare e l'esaurimento delle riserve, e porta all'induzione dello stato VBNC. La presenza di cellule batteriche in questo particolare stato di dormienza all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti può costituire un potenziale rischio per la salute dei consumatori: queste cellule, infatti, non vengono rilevate dai metodi colturali di sorveglianza utilizzati tradizionalmente (Widemann *et al.*, 2021; Foong & Dickson, 2004). Non essendo coltivabili, possono essere rilevate unicamente attraverso l'utilizzo di metodi alternativi, che consentono di distinguere cellule vitali, cellule morte e cellule VBNC. In particolare, una delle metodologie più utilizzate è la PCR real-time con *propidium monoazide* (PMA). Il PMA è un agente intercalante del DNA, in grado di legare in maniera irreversibile il DNA libero o il DNA delle cellule morte con membrana danneggiata. Il DNA a cui il PMA si lega non viene amplificato durante la successiva reazione di PCR real-time e questa restituisce quindi unicamente una stima delle cellule vitali presenti (Widemann *et al.*, 2021; Gurreesch *et al.*, 2016).

Affinché lo stato VBNC rappresenti una strategia di sopravvivenza efficace, le cellule batteriche che si trovano in questo stato devono essere in grado di rianimarsi quando si ripresentano le condizioni ambientali che ne favoriscono la crescita. La rianimazione consente la coltivazione di queste cellule. Attualmente, però, delle oltre 100 specie che sono in grado di entrare in uno stato VBNC, solo di una piccola parte si è a conoscenza della possibilità di rianimazione. Per alcune specie batteriche la rianimazione avviene solo in seguito all'ap-

plicazione di trattamenti specifici, mentre per altre è sufficiente l'utilizzo di un terreno nutritivo per un periodo di tempo più o meno prolungato (Ayrapetyan *et al.*, 2018).

Anche nel caso di *L. monocytogenes*, è possibile che la presenza di condizioni meno stressanti (come succede nel caso del trasferimento dalle superfici agli alimenti) stimolino la rianimazione del batterio. *L. monocytogenes*, quindi, potrebbe riacquistare virulenza e scatenare l'infezione nell'ospite in seguito ad ingestione. È opportuno ampliare ulteriormente le conoscenze in questo ambito: se veramente *L. monocytogenes* fosse in grado di rianimarsi così facilmente, sarebbe cruciale rilevare la presenza del patogeno all'interno degli impianti di trasformazione degli alimenti anche quando questo si trova nello stato VBNC (Widemann *et al.*, 2021).

3. Scopo della tesi

La persistenza di *Listeria monocytogenes* all'interno degli impianti di produzione degli alimenti può costituire un problema rilevante nella gestione della sicurezza alimentare.

Lo scopo di questa tesi è stato proprio quello di approfondire le conoscenze riguardo la persistenza di questo patogeno. In particolare, è stata studiata la persistenza di tre ceppi di *L. monocytogenes* isolati dall'industria alimentare inoculati in *Minimal Bacterial Medium* (MBM), un terreno a composizione principalmente salina con lo scopo di mimare le condizioni che il patogeno normalmente trova in corrispondenza delle superfici degli impianti di lavorazione degli alimenti. Le colture sono state monitorate in due condizioni differenti: in presenza di una temperatura ottimale per il batterio (30°C) e in presenza di una temperatura di refrigerazione (4°C). Nel primo caso, quindi, era presente un singolo stress (stress da mancanza di nutrienti), mentre nel secondo caso è stato osservato l'andamento della coltura in presenza di due stress combinati (stress da mancanza di nutrienti e stress da freddo). Le colture sono state monitorate settimanalmente per tre mesi (12 settimane) attraverso conta su piastra in ALOA (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium*) o PCA (*Plate Count Agar*). In aggiunta, è stata effettuata una PCR real-time in corrispondenza dell'inizio, della metà e della fine dell'esperimento e settimanalmente sono stati raccolti dei campioni dalle colture per un eventuale sequenziamento futuro. Le colture, inoltre, sono state testate per la loro capacità di formare biofilm eseguendo un apposito test all'inizio, alla metà e alla fine dell'esperimento.

Materiali e metodi

1. Preparazione dei ceppi

I tre ceppi selezionati per lo studio si trovavano conservati in purezza in congelatore a -24°C presso la sede di Trento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE). Questi sono stati scongelati e successivamente rivitalizzati attraverso inoculo nel terreno di arricchimento TSB+YE (*Tryptic Soy Broth + Yeast Extract*). I ceppi sono stati posti a 30°C per circa 24 ore e successivamente sono stati seminati tramite l'utilizzo di tre anse sterili su una piastra di Agar Sangue (AS) divisa in tre settori, uno per ceppo. La piastra ottenuta è stata incubata capovolta a 30°C . Dopo circa 24 ore si è osservata crescita per tutti e tre i ceppi.

2. Curve di crescita

Per la costruzione delle curve di crescita, per ogni ceppo è stata preparata una provetta contenente 3 ml di soluzione fisiologica (SF). Attraverso un cotton fioc si è prelevata una piccola quantità di cellule per ogni ceppo dalla piastra di AS preparata in precedenza. Le cellule sono state stemperate all'interno della provetta corrispondente contenente la SF, fino a raggiungere un valore di torbidità pari a 0.4 McFarland (corrispondente ad una concentrazione di circa 10^8 UFC/ml). La misura della torbidità è stata eseguita mediante un densitometro (DEN-1 della Biosan). Successivamente sono state eseguite delle diluizioni in Soluzione Triptone (ST) fino a raggiungere una concentrazione di 10^3 UFC/ml, secondo lo schema riportato in *Figura 6*.

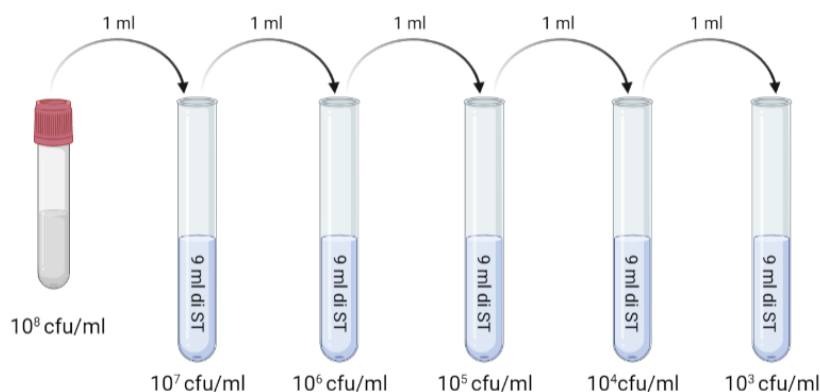


Figura 6. Schema per le diluizioni in ST (immagine realizzata con BioRender.com)

Dall'ultima diluizione di ogni ceppo è stato prelevato 1 ml (circa 10^3 UFC), che è stato trasferito rispettivamente all'interno di tre Falcon da 50 ml contenenti 39 ml di TSB+YE, in modo tale da ottenere una concentrazione di circa 25 UFC/ml. Le tre Falcon sono state incubate a 30°C per circa 10 ore. Successivamente si è iniziato a monitorare la crescita di ciascun ceppo attraverso due misurazioni che sono state eseguite ogni ora: la lettura del valore di assorbanza a 600 nm allo spettrofotometro (GeneQuant 1300 della Biochrom) e la conta su piastra in PCA (*Plate Count Agar*) per inclusione, secondo le modalità riportate nel paragrafo 3.1.

3. Preparazione delle *long-term cultures*

Per la fase sperimentale delle *long-term cultures*, è stata allestita una Falcon contenente 39 ml di TSB+YE per ogni ceppo al fine di ottenere circa 25 UFC/ml. Tale concentrazione è stata ottenuta procedendo come sopra descritto. Le tre Falcon sono state incubate a 30°C per il tempo necessario al raggiungimento della fase pre-stazionaria, corrispondente ad una concentrazione di circa 10^8 UFC/ml. Il momento in cui le colture raggiungevano la fase pre-stazionaria è stato identificato attraverso le curve di crescita costruite in precedenza. A questo punto, da ognuna delle tre Falcon è stata prelevata un'aliquota di 1 ml, necessaria in un secondo momento per la costruzione di una curva standard, come descritto nel paragrafo 4.4. Successivamente, ciascuna Falcon è stata centrifugata per 15 minuti a 3500 rpm, è stato rimosso il surnatante e il pellet è stato lavato e risospeso in 30 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline). Le Falcon sono state quindi ricentrifugate, è stato nuovamente rimosso il surnatante e il pellet ottenuto è stato risospeso in 40 ml di *Minimal Bacterial Medium* (MBM). A partire dalle tre Falcon ottenute (una per ceppo), è stata eseguita una conta su piastra in PCA per inclusione in modo tale da poter ricavare la concentrazione esatta delle cellule di *Listeria monocytogenes* presenti all'interno delle Falcon al tempo zero (nel pre-inoculo). I passaggi necessari per lo svolgimento della conta su piastra in PCA sono riportati nel paragrafo successivo (3.1). Per concludere, per ottenere l'inoculo vero e proprio, sono stati prelevati 3 ml da ciascuna Falcon, che sono stati trasferiti all'interno di una nuova Falcon da 50 ml, a cui sono stati aggiunti altri 27 ml di MBM. Questa operazione è stata ripetuta per 10 volte per ognuna delle tre Falcon. Per ogni ceppo, quindi, sono state incubate cinque Falcon a 30°C e cinque Falcon a 4°C. L'incubazione prevista era di 12 settimane (3 mesi).

3.1 Conta su piastra al tempo zero

La conta su piastra al tempo zero è stata eseguita per avere una stima della concentrazione delle cellule batteriche presenti nelle Falcon al momento del pre-inoculo in MBM (in corrispondenza della fase pre-stazionaria). Dopo aver risospeso il pellet in MBM come descritto in precedenza, sono state eseguite delle diluizioni in ST come riportato in *Figura 7*, fino ad arrivare alle diluizioni 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} per ogni ceppo. Dalle provette contenenti queste tre diluizioni è stato prelevato 1 ml di campione per ogni ceppo, che è stato posto all'interno di una piastra Petri. Successivamente, all'interno delle piastre sono stati versati circa 12-15 ml di PCA fuso mantenuto a 45°C ; ogni piastra è stata miscelata attraverso lievi movimenti circolari.

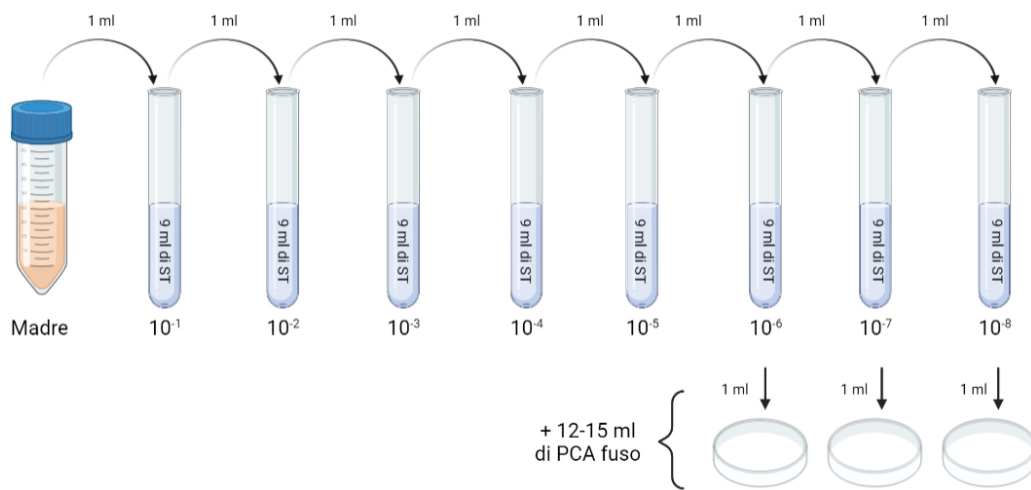


Figura 7. Schema riassuntivo per l'esecuzione della conta su piastra al tempo zero (immagine realizzata con BioRender.com)

Le piastre sono state lasciate solidificare su una superficie orizzontale per circa 10 minuti e successivamente sono state poste ad incubare in posizione capovolta a 30°C per 72 ore.

Trascorso il tempo, sono state contate tutte le colonie presenti sulle piastre (escludendo le piastre con più di 300 colonie). Sono state prese in considerazione due delle tre piastre disponibili con due diluizioni successive e sono state utilizzate per calcolare il numero N di cellule di *Listeria monocytogenes* presenti per ml, utilizzando la seguente formula:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Dove:

$\sum C$ = somma delle colonie contate nelle due piastre considerate

V = volume di inoculo utilizzato in ciascuna piastra in ml

n_1 = numero di piastre considerate nella prima diluizione

n_2 = numero di piastre considerate nella seconda diluizione

d = prima diluizione considerata

4. Monitoraggio delle *long-term cultures*

Le *long term-cultures* sono state monitorate per 3 mesi (12 settimane) attraverso conta su piastra, estrazione del DNA, PCR real-time e test del biofilm. Settimanalmente, inoltre, sono stati conservati 100 μ l di campione per ogni Falcon per un possibile sequenziamento futuro.

4.1 Conta su piastra

La conta su piastra è stata eseguita su due terreni, PCA e ALOA (*Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium*) (Ottaviani & Agosti, 1997). Per effettuare la conta su piastra in ALOA e PCA sono state eseguite inizialmente delle diluizioni in ST, analogamente a quanto riportato nella *Figura 7*, fino ad arrivare a due diluizioni consecutive desiderate. Le diluizioni da piastrare sono state decise settimanalmente, in base all'andamento delle colture e ai dati relativi alla conta su piastra delle settimane precedenti.

Per la conta su piastra in ALOA sono stati prelevati 100 μ l di campione dalle due provette contenenti le diluizioni consecutive di interesse e sono stati piastrati per spatolamento in ALOA. Le piastre sono state messe ad incubare capovolte per circa 48 ore a 30°C, al termine delle quali è stata eseguita la conta delle colonie tipiche riferibili a *Listeria monocytogenes*. La stima del numero N di cellule di *L. monocytogenes* presenti per ml è stata calcolata utilizzando la stessa formula riportata in precedenza nel paragrafo 3.1

Per effettuare la conta su piastra in PCA è stato eseguito lo stesso procedimento riportato nel paragrafo 3.1, prelevando 1 ml da ciascuna Falcon relativa alle *long-term cultures* incubate a 4°C e a 30°C.

4.2 Estrazione del DNA

In corrispondenza del tempo zero (prima settimana), di metà esperimento (quarta settimana) e di fine esperimento (decima settimana) si è proceduto all'estrazione del DNA. L'estrazione dell'acido nucleico DNA è stata effettuata mediante il kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* II della Bio-Rad. Da ogni Falcon relativa a *long-term cultures* incubate a 4°C e a 30°C sono stati prelevati 100 μ l di coltura e trasferiti in eppendorf da 1.5 ml contenenti 100 μ l di *Lysis reagent*. Successivamente, le eppendorf sono state poste all'interno di un Cell disruptor (Disruptor Genie™ Digital Cell Disruptor della Fisher Scientific) per 3 minuti e quindi traslate

in un termoblocco (SBH200D/3 della Stuart™) a 95-100°C per 15 minuti. Le eppendorf sono state poi centrifugate a 12500 rpm per 5 minuti e poste in congelatore a -24°C.

4.3 PCR real-time

Gli estratti di tutti i campioni corrispondenti a questi tre punti temporali (inizio, metà e fine esperimento) sono stati scongelati e utilizzati per l'esecuzione di un saggio per il rilevamento di *Listeria monocytogenes* basato sull'esecuzione di una PCR real-time, secondo quanto riportato da Roberts *et al.* (2009). Per eseguire questa PCR real-time innanzitutto sono stati preparati i primer. In particolare, sono stati utilizzati i primer forward e reverse del gene *rpoB* che codifica per la subunità beta dell'RNA polimerasi di *Listeria monocytogenes*.

La sequenza dei primer utilizzati è riportata di seguito.

- rpoB_F TGT AAA ATA TGG ACG GCA TCG T (*primer forward*)
- rpoB_R GCT GTT TGA ATC TCA ATT AAG TTT GG (*primer reverse*)

Questi primer erano conservati liofilizzati, quindi sono stati diluiti con H₂O per biologia molecolare in modo tale da ottenere una madre con una concentrazione pari a 500 µM. In seguito, le madri sono state diluite 50 volte, per ottenere delle aliquote da lavoro con una concentrazione pari a 10 µM. Si è proceduto, quindi, con la preparazione della Master Mix per la reazione di PCR real-time secondo la seguente tabella.

| Mix | 1X |
|-------------------------------|---------|
| PowerUp SYBR Green Master Mix | 5 µl |
| Primer forward (10 µM) | 0.25 µl |
| Primer reverse (10 µM) | 0.25 µl |
| Acqua | 2 µl |
| DNA | 2.5 µl |

Tabella 2. Reagenti necessari alla preparazione della Master Mix per la reazione di PCR real-time per un singolo campione

A questo punto è stata eseguita la reazione di PCR real-time, utilizzando il termociclatore LightCycler® 480 della Roche. Il ciclo termico utilizzato prevedeva un primo step della durata di 2 minuti a 50°C necessario per l'attivazione dell'enzima UNG presente all'interno della Master Mix. È stato poi impostato un secondo step della durata di 2 minuti a 95°C durante il quale avviene la denaturazione iniziale, seguito da 45 cicli comprendenti 10 se-

condi a 95°C (denaturazione) e 40 secondi a 60°C (annealing ed estensione). In conclusione, è stato impostato un ultimo ciclo necessario alla costruzione della Melting Curve, durante il quale la temperatura è stata portata lentamente fino a 95°C.

4.4 Costruzione di una curva standard

Contemporaneamente all'esecuzione della reazione di PCR real-time per i campioni delle tre date designate, è stata costruita anche una curva standard, in modo tale da poter effettuare una quantificazione delle cellule di *Listeria monocytogenes* presenti nei campioni in questione. Per la costruzione di questa curva standard sono state utilizzate le aliquote di 1 ml prelevate al momento del raggiungimento della fase pre-stazionaria, come descritto in precedenza nel paragrafo 3. I campioni prelevati, secondo le informazioni raccolte durante la costruzione della curva di crescita, presentavano una concentrazione di circa 10^8 UFC/ml. A partire dalle tre aliquote prelevate dalle tre Falcon è stata eseguita l'estrazione del DNA utilizzando il kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* II della Bio-Rad secondo quanto riportato nel paragrafo 4.2. Gli estratti sono stati quindi diluiti in modo tale da ottenere otto diluizioni scalari 1:2. Queste sono state successivamente utilizzate per eseguire una PCR real-time (secondo il protocollo riportato nel paragrafo 4.3) e i risultati ottenuti hanno consentito la costruzione di una curva standard per ciascun ceppo.

4.5 Test del biofilm

Il test del biofilm è stato effettuato tre volte: all'inizio (prima settimana), a metà (nona settimana) e alla fine dell'esperimento (dodicesima settimana). Per eseguire il test sono state utilizzate delle piastre multiwell da 96 pozzetti. All'interno di ogni pozzetto sono stati aggiunti 198 µl di TSB+YE e 2 µl prelevati da ciascuna Falcon (sia a 4°C che a 30°C). Per ogni campione sono state eseguite sei repliche. Sei pozzetti sono stati utilizzati per il bianco e riempiti solo con TSB+YE. Le piastre sono state successivamente incubate a temperatura ambiente per 24 ore. Trascorso il tempo di incubazione, i pozzetti sono stati svuotati e il contenuto di un pozzetto per Falcon è stato utilizzato per stimare il numero di cellule planctoniche, attraverso diluizioni in ST seguite da conta su piastra in PCA. In seguito, tutti i pozzetti sono stati sottoposti a tre lavaggi con 200 µl di SF. Le piastre sono state quindi poste ad asciugare all'interno di un termostato a 55°C per 40 minuti. Ad ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 200 µl di *crystal violet* 5% e le piastre sono state incubate per 15 minuti a temperatura ambiente. Sono stati eseguiti tre lavaggi utilizzando 200 µl di acqua deionizzata e

le piastre sono state lasciate asciugare per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di etanolo 95% ghiacciato per solubilizzare il colorante ed è stata letta l'assorbanza a 570 nm allo spettrofotometro (Thermo Scientific™ Multiscan™ GO).

5. Soluzioni e terreni utilizzati

Tutte le soluzioni e i terreni utilizzati per lo svolgimento di questo esperimento sono stati forniti dal Centro Servizi alla Produzione (CSP) dell'IZSVe.

- Tryptone Soy Broth + Yeast Extract (TSB+YE)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|--------------------------------|----------------|
| Tryptone | 17 |
| Soy peptone | 3 |
| Sodium chloride | 5 |
| Dipotassium hydrogen phosphate | 2.5 |
| Dextrose | 2.5 |
| Yeast extract | 6 |

pH finale 7.3 ± 0.2

- Agar Sangue (AS)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|--------------------------|----------------|
| Meat peptone | 15 |
| Liver digest | 2.5 |
| Yeast extract | 5 |
| Sodium chloride | 5 |
| Agar | 12 |
| Sheep Blood Defibrinated | 50 (ml/l) |

pH finale 7.2 ± 0.2

- Soluzione fisiologica (SF)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|-----------------|----------------|
| Sodium Chloride | 9 |

pH finale 7.0 ± 0.2

- Soluzione Triptone (ST)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|-------------------|-----------------------|
| Tryptone | 1 |
| Sodium chloride | 8.5 |

pH finale 7.0 ± 0.2

- Plate Count Agar (PCA)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|-----------------------------|-----------------------|
| Yeast extract | 2.5 |
| Pancreatic digest of casein | 5 |
| Glucose | 1 |
| Agar | 15 |

pH finale 7.0 ± 0.2

- Phosphate Buffered Saline (PBS)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|-------------------------------|-----------------------|
| Sodium chloride | 8 |
| Potassium chloride | 0.2 |
| Sodium Phosphate Dibasic | 1.44 |
| Potassium Phosphate Monobasic | 0.245 |

pH finale 7.4 ± 0.2

- Minimal Bacterial Medium (MBM)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|--|-----------------------|
| K_2HPO_4 | 7 |
| KH_2PO_4 | 3 |
| Trisodium citrate $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ | 0.5 |
| MgSO ₄ heptahydrate | 0.1 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 1 |
| Glucose | 2 |

pH finale 7.0 ± 0.2

- Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti medium (ALOA)

| Componenti | Quantità (g/l) |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Peptone | 18 |
| Yeast extract | 10 |
| Tryptone | 6 |
| Sodium pyruvate | 2 |
| Glucose | 2 |
| Magnesium glycerophosphate | 1 |
| Magnesium sulphate | 0.5 |
| Sodium chloride | 5 |
| Di-sodium hydrogen phosphate | 2.5 |
| Lithium chloride | 10 |
| X-Glucoside | 0.05 |
| Agar | 15 |
| Nalidixic acid | 0.02 |
| Ceftazidime | 0.02 |
| Cycloheximide | 0.05 |
| Polymyxin B | 0.01 |
| L- α -phosphatidylinositol | 2 |

pH finale 7.2 ± 0.2

Risultati

1. Selezione dei ceppi per l'esperimento di *long-term cultures*

Per lo svolgimento di questa tesi sono stati selezionati tre ceppi di *Listeria monocytogenes* geneticamente diversi tra loro. Come primo ceppo è stato scelto un ceppo di riferimento, depositato in ATCC (*American Type Culture Collection*) con il numero 19111 (lineage II, Sequence Type (ST) 12). Si tratta di un ceppo originariamente isolato da pollame, di cui è disponibile il sequenziamento dell'intero genoma. Comunemente viene utilizzato nella ricerca su malattie enteriche ed infettive e per test su alimenti e terreni (<https://www.atcc.org/products/19111>).

Sono stati scelti due ulteriori ceppi di *L. monocytogenes* dalla ceppoteca della sede di Trento dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe): *Lm246* e *Lm113*. *Lm246* (lineage I, ST5) è stato isolato da trota affumicata, mentre *Lm113* (lineage II, ST9) è stato isolato dalla superficie di un impianto di lavorazione della carne.

2. Curve di crescita

In una fase preliminare dell'esperimento, è stata costruita una curva di crescita per ognuno dei tre ceppi in esame per definire esattamente le tempistiche per il pre-inoculo della *long-term culture*. Per ogni ceppo sono state costruite due curve di crescita che sono state successivamente confrontate tra loro per poter individuare dopo quante ore le colture raggiungevano la fase pre-stazionaria. Una curva è stata costruita basandosi sulla lettura dei valori di assorbanza (OD_{600}) allo spettrofotometro. La seconda curva, invece, è stata costruita basandosi sui risultati ottenuti dalla conta su piastra su PCA. In particolare, a partire dalle conte su piastra ottenute, è stato calcolato N (numero di cellule per ml) e quindi il logaritmo in base 10 di N. Quest'ultimo valore (\log) è stato utilizzato per la costruzione delle curve di crescita.

Il monitoraggio attraverso la lettura dell'assorbanza e attraverso la conta su piastra è stato effettuato ogni ora o ogni mezz'ora nel momento in cui i valori ottenuti sembravano indicare il raggiungimento della fase pre-stazionaria. Il primo monitoraggio è stato effettuato dopo circa 9/10 ore dal momento dell'incubazione. Per ogni ceppo sono state eseguite due o tre repliche, in modo tale da costruire una curva che fosse il più possibile attendibile.

Listeria monocytogenes 246

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|-----|-----|----|----|-----|------------------------|-----|
| | | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | -10 | | |
| 10.5 | 0.162 | 48 | 12 | 0 | 0 | – | – | 5.45 x 10 ⁶ | 6.7 |
| 11.5 | 0.200 | 164 | 12 | 1 | 0 | – | – | 1.60 x 10 ⁷ | 7.2 |
| 12.5 | 0.676 | >300 | 125 | 13 | 4 | – | – | 1.25 x 10 ⁸ | 8.1 |
| 13.5 | 1.510 | – | 184 | 36 | 4 | 0 | – | 3.64 x 10 ⁹ | 8.6 |
| 14 | 2.584 | – | – | 128 | 10 | 0 | 0 | 1.25 x 10 ⁹ | 9.1 |
| 14.5 | 3.260 | – | – | 42 | 9 | 0 | 0 | 4.63 x 10 ⁸ | 8.7 |
| 15 | 3.876 | – | – | 139 | 17 | 1 | 0 | 1.42 x 10 ⁹ | 9.2 |
| 15.5 | 3.924 | – | – | 127 | 16 | 5 | 0 | 1.30 x 10 ⁹ | 9.1 |
| 16 | 3.956 | – | – | 216 | 17 | 3 | 0 | 2.12 x 10 ⁹ | 9.3 |
| 16.5 | 3.906 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 17 | 3.994 | – | – | – | – | – | – | – | – |

Tabella 3.1. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo Lm246 (replica 1)

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|------|-----|----|----|-----|------------------------|-----|
| | | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | -10 | | |
| 10.5 | 0.080 | 185 | 29 | 2 | 0 | – | – | 1.95 x 10 ⁷ | 7.3 |
| 11.5 | 0.306 | >300 | 35 | 10 | 0 | – | – | 4.09 x 10 ⁷ | 7.6 |
| 12.5 | 0.920 | >300 | 134 | 17 | 3 | – | – | 1.37 x 10 ⁸ | 8.1 |
| 13.5 | 2.388 | – | >300 | 48 | 5 | 0 | – | 4.82 x 10 ⁸ | 8.7 |
| 14 | 3.458 | – | – | 36 | 5 | 2 | 0 | 3.73 x 10 ⁸ | 8.6 |
| 14.5 | 4.180 | – | – | 108 | 20 | 5 | 0 | 1.16 x 10 ⁹ | 9.1 |
| 15 | 4.274 | – | – | 83 | 10 | 1 | 0 | 8.45 x 10 ⁸ | 8.9 |
| 15.5 | 4.312 | – | – | 74 | 7 | 3 | 0 | 7.36 x 10 ⁸ | 8.9 |
| 16 | 4.326 | – | – | 152 | 19 | 4 | 0 | 1.55 x 10 ⁹ | 9.2 |
| 16.5 | 4.222 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 17 | 4.126 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 17.5 | 4.210 | – | – | – | – | – | – | – | – |

Tabella 3.2. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo Lm246 (replica 2)

A partire dai dati riportati nelle due tabelle sono stati costruiti due grafici. Sull'asse delle ascisse è stato posto il tempo (in ore), mentre sull'asse delle ordinate sono stati posti i valori di assorbanza (*Grafico 1.1*) e i valori di log (*Grafico 1.2*). All'interno dello stesso grafico è stata riportata sia la curva relativa alla replica 1 (in rosa), sia la curva relativa alla replica 2 (in verde).

Curva di crescita di *Listeria monocytogenes* 246 (assorbanza)

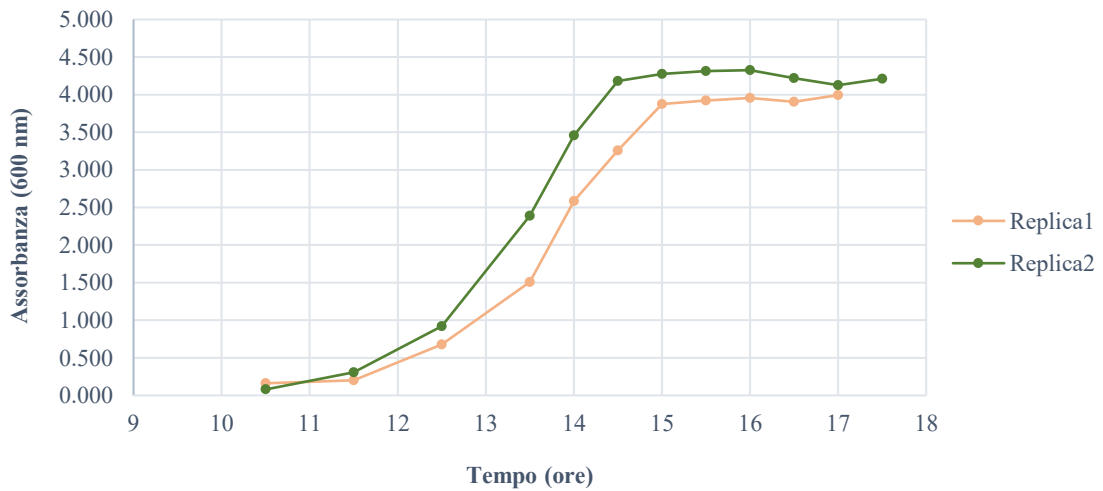


Grafico 1.1. Curve di crescita di Lm246 costruite basandosi sui valori di assorbanza (OD₆₀₀)

Curva di crescita di *Listeria monocytogenes* 246 (log)

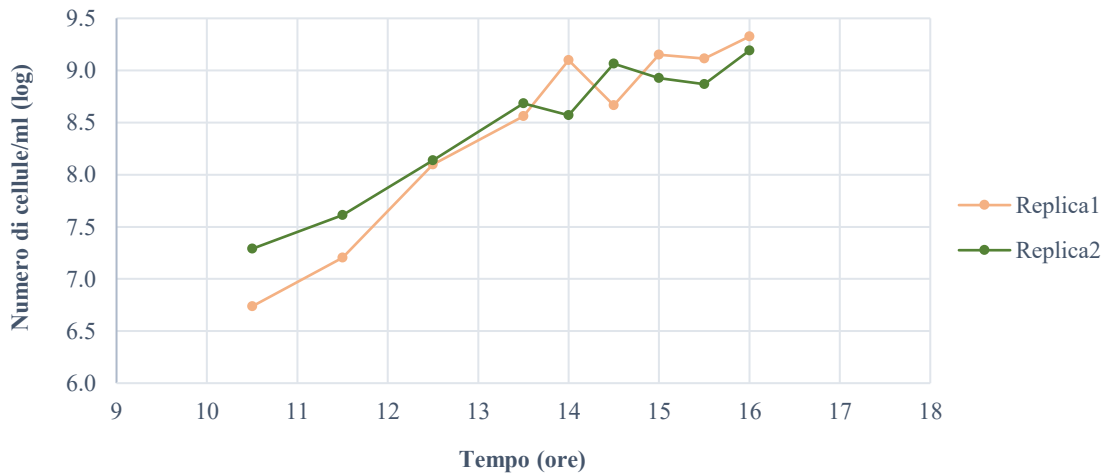


Grafico 1.2. Curve di crescita di Lm246 costruite basandosi sui valori di log

Listeria monocytogenes 113

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|----|----|----|----|----|------------------------|-----|
| | | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| 9.5 | -0.036 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 11 | 0.140 | 153 | 23 | 0 | 1 | – | – | 1.60 x 10 ⁶ | 6.2 |
| 12 | 0.000 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 13 | 0.000 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 14 | 0.012 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 15 | 0.244 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 16 | 0.318 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 17 | 0.382 | – | – | – | – | – | – | – | – |

Tabella 4.1. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo Lm113 (replica 1)

In questa tabella si può notare in maniera particolare come, per questa prima replica, siano stati raccolti quasi esclusivamente i dati relativi all'assorbanza. La scelta deriva dal fatto che non osservando grandi cambiamenti a livello di assorbanza con il passare delle ore, si è pensato fosse troppo presto per osservare l'arrivo alla fase pre-stazionaria, quindi fosse superfluo effettuare anche le conte su piastra (che richiedono un maggior consumo di tempo e materiale rispetto alla lettura dell'assorbanza).

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|------|------|-----|----|----|------------------------|-----|
| | | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| 14.5 | 0.050 | >300 | 267 | 32 | – | – | – | 2.72 x 10 ⁷ | 7.4 |
| 15.5 | 0.050 | >300 | 528 | 59 | – | – | – | 5.34 x 10 ⁷ | 7.7 |
| 16.5 | 0.244 | >300 | >300 | 102 | 18 | – | – | 1.09 x 10 ⁸ | 8.0 |
| 17.5 | 0.466 | – | >300 | 95 | 18 | 1 | – | 1.03 x 10 ⁸ | 8.0 |
| 18.5 | 1.260 | – | – | >300 | 63 | 8 | 1 | 6.45 x 10 ⁸ | 8.8 |
| 19.5 | 1.812 | – | – | >300 | 78 | 4 | 0 | 7.45 x 10 ⁸ | 8.9 |
| 20.5 | 3.018 | – | – | >300 | 100 | 16 | 2 | 1.05 x 10 ⁹ | 9.0 |
| 21.25 | – | – | – | >300 | 199 | 15 | 3 | 1.95 x 10 ⁹ | 9.3 |

Tabella 4.2. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo Lm113 (replica 2)

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|------|------|-----|----|----|------------------------|-----|
| | | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| 17 | 0.034 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 18 | 0.074 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 19 | 0.184 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 20 | 0.516 | – | >300 | 260 | 27 | 2 | – | 2.64 x 10 ⁸ | 8.4 |
| 21 | 1.158 | – | – | >300 | 57 | 8 | 0 | 5.91 x 10 ⁸ | 8.8 |
| 21.5 | 1.834 | – | – | >300 | 56 | 4 | 0 | 5.45 x 10 ⁸ | 8.7 |
| 22 | 2.182 | – | – | >300 | 166 | 12 | 4 | 1.62 x 10 ⁹ | 9.2 |
| 22.5 | 2.852 | – | – | >300 | 89 | 7 | 1 | 8.73 x 10 ⁸ | 8.9 |
| 23 | 3.114 | – | – | >300 | 156 | 9 | 1 | 1.50 x 10 ⁹ | 9.2 |
| 23.5 | 3.164 | – | – | >300 | 71 | 5 | 1 | 6.91 x 10 ⁸ | 8.8 |
| 24 | 3.202 | – | – | – | 95 | 25 | 2 | 1.09 x 10 ⁹ | 9.0 |

Tabella 4.3. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo Lm113 (replica 3)

Anche in questo caso, a partire dai dati riportati nelle tre tabelle sono stati costruiti i due grafici con le curve di crescita. All'interno dello stesso grafico è stata riportata sia la curva relativa alla replica 1 (in rosa), sia la curva relativa alla replica 2 (in verde), sia la curva relativa alla replica 3 (in giallo scuro).

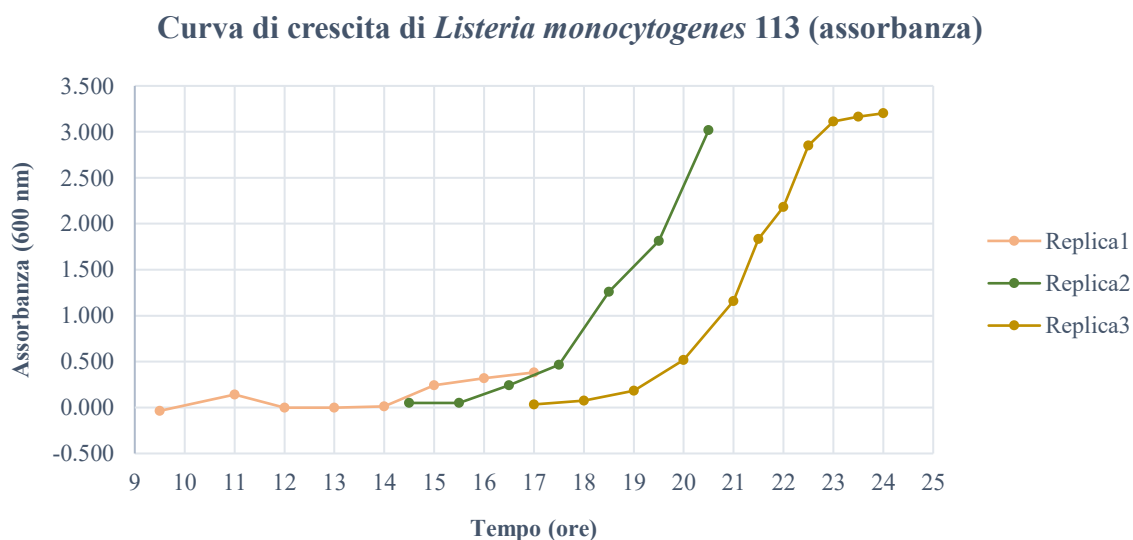


Grafico 2.1. Curve di crescita di Lm113 costruite basandosi sui valori di assorbanza (OD₆₀₀)

Curva di crescita di *Listeria monocytogenes* 113 (log)

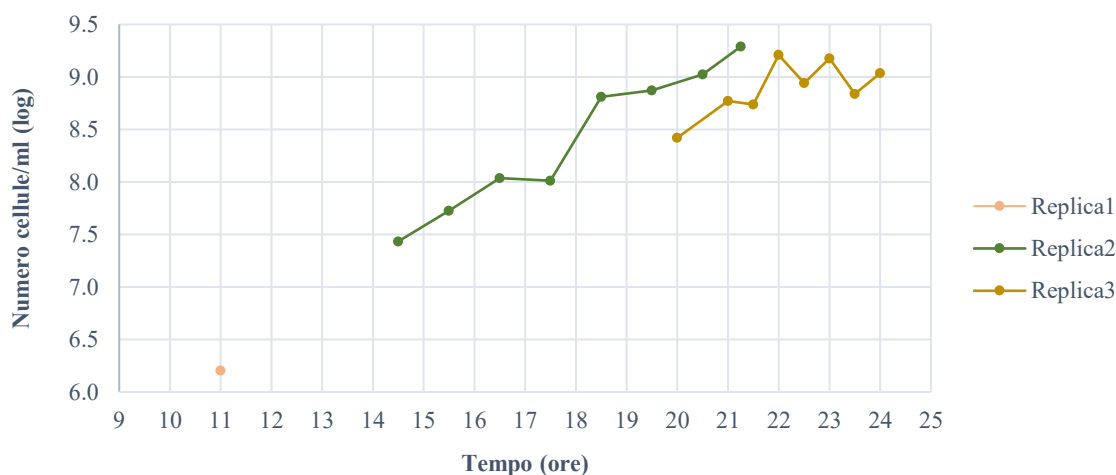


Grafico 2.2. Curve di crescita di Lm113 costruite basandosi sui valori di log

Listeria monocytogenes 19111

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|----|----|----|----|----|--------------------|-----|
| | | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| 10.5 | 0.086 | – | 13 | 1 | 0 | 0 | – | 1.27×10^6 | 6.1 |
| 11.5 | -0.076 | 140 | 10 | 1 | 0 | – | – | 1.36×10^6 | 6.1 |
| 12.5 | -0.102 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 13.5 | -0.044 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 14.5 | 0.124 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 15.5 | 0.026 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 16.5 | 0.106 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 17 | 0.35 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 17.5 | 0.45 | – | – | – | – | – | – | – | – |

Tabella 5.1. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo Lm19111 (replica 1)

In questa tabella, come visto anche in precedenza per *Lm113*, si può notare come siano stati raccolti quasi esclusivamente i dati relativi all'assorbanza e manchino quasi completamente le conte su piastra. Anche in questo caso, la scelta deriva dal fatto che non osservando grandi cambiamenti a livello di assorbanza con il passare delle ore, si è pensato fosse troppo presto per osservare l'arrivo alla fase pre-stazionaria, quindi fosse superfluo effettuare le conte.

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|------|------|-----|----|----|--------------------|-----|
| | | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| 17 | 0.004 | >300 | >300 | 37 | 4 | – | – | 3.73×10^7 | 7.6 |
| 18 | 0.032 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 19 | 0.142 | >300 | >300 | 154 | 18 | – | – | 1.56×10^8 | 8.2 |
| 20 | 0.654 | – | >300 | 259 | 19 | 1 | – | 2.53×10^8 | 8.4 |
| 21 | 1.022 | – | – | >300 | 89 | 6 | 0 | 8.64×10^8 | 8.9 |
| 21.5 | 1.504 | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 22 | 1.956 | – | – | >300 | 167 | 13 | 0 | 1.64×10^9 | 9.2 |
| 22.5 | 2.482 | – | – | >300 | 206 | 21 | 2 | 2.06×10^9 | 9.3 |
| 23 | 2.748 | – | – | >300 | 149 | 15 | 1 | 1.49×10^9 | 9.2 |
| 23.5 | 2.826 | – | – | >300 | 112 | 9 | 0 | 1.10×10^9 | 9.0 |
| 24 | 2.868 | – | – | >300 | 195 | 13 | 2 | 1.89×10^9 | 9.3 |
| 24.5 | 2.856 | – | – | – | – | – | – | – | – |

Tabella 5.2. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo *Lm19111* (replica 2)

| Tempo (ore) | Assorbanza (600 nm) | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log |
|-------------|---------------------|-----------------------------|----|------|-----|----|----|--------------------|-----|
| | | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 | -9 | | |
| 18.75 | 0.912 | – | – | >300 | 27 | 4 | 1 | 2.82×10^8 | 8.4 |
| 19.75 | 1.632 | – | – | >300 | 106 | 13 | 0 | 1.08×10^9 | 9.0 |
| 20.25 | 2.188 | – | – | >300 | 115 | 4 | 0 | 1.08×10^9 | 9.0 |
| 20.75 | 2.650 | – | – | >300 | 92 | 16 | 2 | 9.82×10^8 | 9.0 |
| 21.25 | 2.676 | – | – | >300 | 76 | 10 | 0 | 7.82×10^8 | 8.9 |
| 21.75 | 2.604 | – | – | >300 | 94 | 13 | 2 | 9.73×10^8 | 9.0 |
| 22.25 | 2.634 | – | – | – | – | – | – | – | – |

Tabella 5.3. Dati raccolti necessari alla costruzione della curva di crescita per il ceppo *Lm19111* (replica 3)

Ancora una volta, a partire dai dati riportati nelle tre tabelle sono stati costruiti i due grafici delle curve di crescita per il ceppo *Lm19111*. All'interno dello stesso grafico è stata riportata sia la curva relativa alla replica 1 (in rosa), sia la curva relativa alla replica 2 (in verde), sia la curva relativa alla replica 3 (in giallo scuro).

Curva di crescita di *Listeria monocytogenes* 19111 (assorbanza)

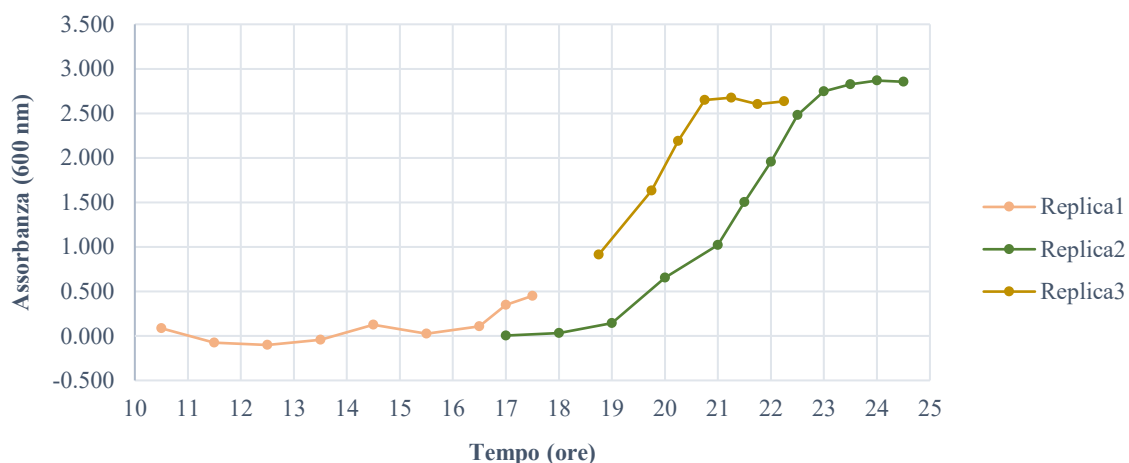


Grafico 3.1. Curve di crescita di *Lm19111* costruite basandosi sui valori di assorbanza (OD_{600})

Curva di crescita di *Listeria monocytogenes* 19111 (log)

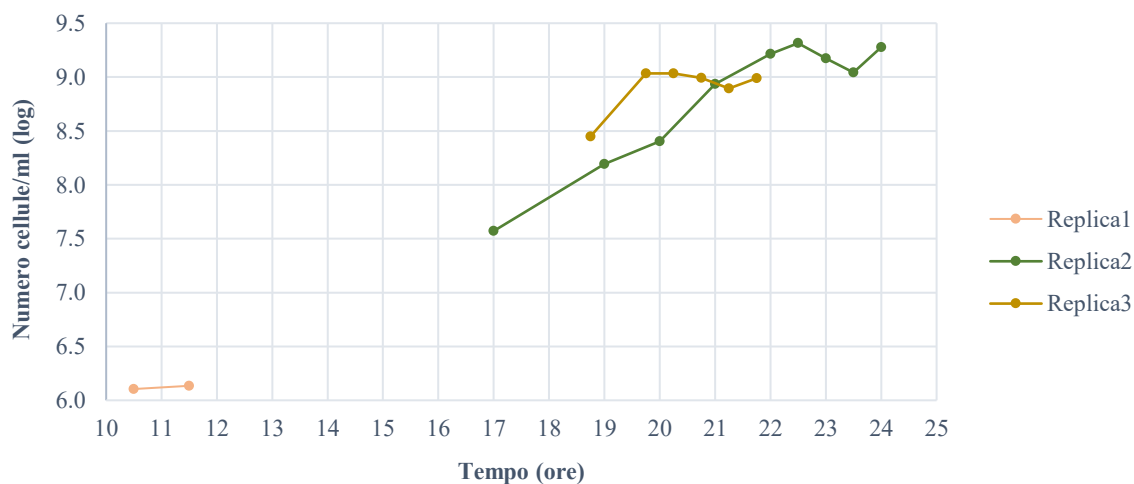


Grafico 3.2. Curve di crescita di *Lm19111* costruite basandosi sui valori di log

Una volta ottenute le due curve di crescita per ciascuno dei tre ceppi di *L. monocytogenes* in esame, è stato individuato il punto temporale in cui le colture si trovavano in una fase antecedente alla stazionaria. Nonostante le curve ottenute mediante la lettura del valore di OD allo spettrofotometro fossero molto ben definite per ciascun ceppo, si è scelto di considerare soprattutto le curve ottenute mediante conta su piastra. La proporzionalità tra valore di OD e densità cellulare, infatti, esiste per valori di $OD \leq 0.4$ (circa).

Attraverso l'osservazione dei grafici sopra riportati, quindi, è stato stabilito che la fase pre-stazionaria veniva raggiunta dopo 14 ore dall'inoculo in TSB+YE per *Lm246* e dopo 18 ore dall'inoculo in TSB+YE per *Lm113* e *Lm19111*.

3. Conta su piastra al tempo zero

Prima della messa a punto delle *long-term cultures* in MBM, sono state eseguite delle conte su piastra in PCA a partire dai tre pre-inoculi al tempo zero (sempre in MBM). Queste conte hanno permesso di ricavare la concentrazione di *Listeria monocytogenes* all'interno delle tre Falcon (contenenti le tre colture, una per ceppo) una volta raggiunta la fase pre-stazionaria. Conoscendo questa concentrazione, è stato poi possibile risalire alla concentrazione di *L. monocytogenes* all'interno di ciascuna coltura al momento dell'inoculo.

Vengono riportati in seguito i valori ottenuti relativi alla conta su piastra al tempo zero per ognuno dei tre ceppi.

| | Diluizioni (numero colonie) | | | N (cell/ml) | log |
|-----------------------|-----------------------------|-----|----|--------------------|-----|
| | -6 | -7 | -8 | | |
| <i>Lm246</i> | – | 209 | 17 | 2.05×10^9 | 9.3 |
| <i>Lm113</i> | 152 | 7 | 1 | 1.45×10^8 | 8.2 |
| <i>Lm19111</i> | 246 | 23 | 3 | 2.45×10^8 | 8.4 |

Tabella 6. Risultati relativi alla conta su piastra in PCA per i tre ceppi in esame al momento del pre-inoculo

Successivamente, sono stati preparati gli inoculi veri e propri, quindi sono state ottenute le dieci colture per ogni ceppo (di cui cinque incubate a 30°C e cinque incubate a 4°C). Rispetto al pre-inoculo, le colture definitive sono state diluite 10 volte. Ci si aspetta, quindi, che la concentrazione di cellule per ml per queste colture sia 10 volte inferiore rispetto a quella riportata in Tabella 6.

4. Monitoraggio delle *long-term cultures*

Una volta ottenute le colture definitive (dieci per ceppo), queste sono state poste ad incubare alle due temperature in esame: cinque colture per ceppo sono state incubate a 30°C e cinque colture per ceppo a 4°C. Si è cominciato quindi a monitorare periodicamente l'andamento di queste colture attraverso conta su piastra (inizialmente in ALOA e successivamente, dove necessario, in PCA), PCR real-time e test del biofilm. In aggiunta sono stati conservati anche 100 µl di campione per un eventuale sequenziamento futuro.

I tre ceppi (suddivisi nelle dieci colture) sono stati monitorati per un totale di 12 settimane, dal 6 luglio 2022 al 22 settembre 2022, secondo le tempistiche riportate in *Tabella 7*.

| | Primo mese | | | | Secondo mese | | | | Terzo mese | | | |
|---|------------|----|----|----|--------------|----|----|----|------------|-----|-----|-----|
| | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 |
| Conta su piastra (ALOA o PCA) | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Estrazione del DNA | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Conservazione di 100 µl di campione (per sequenziamento futuro) | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| PCR real-time | 1 | | | 1 | | | | | | 1 | | |
| Test del biofilm | 1 | | | | | | | | 1 | | | 1 |

Tabella 7. Tabella riassuntiva di tutti i monitoraggi eseguiti durante le 12 settimane di esperimento con le rispettive cadenze temporali

5. Monitoraggio delle *long-term cultures* – conta su piastra

Nel complesso, nel corso delle 12 settimane di esperimento, la conta su piastra (in ALOA o in PCA) è stato il metodo di monitoraggio che ha consentito di raccogliere il maggior numero di informazioni riguardo le colture in esame. In seguito vengono riportati tutti i dati raccolti relativamente alla conta su piastra per ognuno dei tre ceppi in esame (sia per le colture incubate a 4°C che per le colture incubate a 30°C).

***Listeria monocytogenes* 246**

Nel corso della prima settimana di esperimento si è iniziato a monitorare l'andamento delle dieci colture del ceppo *Lm246* attraverso una conta su piastra in ALOA.

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati ottenuti.

| Lm246 – 4°C | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| Coltura 1 | | | | | | | | Coltura 2 | | | | | |
| | | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log |
| | | -3 | -4 | -5 | -6 | | | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | 0 | 0 | 0 | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| | 2 | 0 | 0 | – | – | 0 | – | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 3 | – | 0 | 0 | – | 0 | – | – | 0 | 0 | – | 0 | – |

| Coltura 3 | | | | | | | | Coltura 4 | | | | | |
|------------------|----------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log |
| | | -3 | -4 | -5 | -6 | | | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | 0 | 0 | 0 | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| | 2 | 0 | 0 | – | – | 0 | – | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 3 | – | 0 | 0 | – | 0 | – | – | 0 | 0 | – | 0 | – |

| Coltura 5 | | | | | | | |
|------------------|----------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log |
| | | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| | 2 | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 3 | – | 0 | 0 | – | 0 | – |

Tabella 8.1. Risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA per le cinque colture di Lm246 poste a 4°C nel corso della prima settimana di esperimento

| Lm246 – 30°C | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|----------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| Coltura 1 | | | | | | | | Coltura 2 | | | | | |
| | | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log |
| | | -3 | -4 | -5 | -6 | | | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | 0 | 0 | 0 | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| | 2 | 0 | 0 | – | – | 0 | – | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 3 | – | – | 0 | 0 | 0 | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |

| | | Coltura 3 | | | | | | Coltura 4 | | | | | |
|----|---|----------------------------|------|-----|----|------------------------|-----|----------------------------|----|----|----|----------------|-----|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log |
| | | -3 | -4 | -5 | -6 | | | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | - | - | 0 | 0 | 0 | - | - | - | 0 | 0 | 0 | - |
| | 2 | >150 | >150 | - | - | ≠0 | ≠0 | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| | 3 | - | - | 103 | 14 | 1.06 x 10 ⁸ | 8.0 | - | - | 0 | 0 | 0 | - |

| | | Coltura 5 | | | | | |
|----|---|----------------------------|----|----|----|----------------|-----|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | | | N (cell/ml) | log |
| | | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | - | - | 0 | 0 | 0 | - |
| | 2 | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| | 3 | - | - | 0 | 0 | 0 | - |

Tabella 8.2. Risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA per le cinque colture di *Lm246* poste a 30°C nel corso della prima settimana di esperimento

Come è possibile osservare all'interno delle tabelle appena riportate, il ceppo *Lm246* ha fatto emergere fin da subito delle problematiche nella conta su piastra in ALOA. Per le cinque colture a 4°C, infatti, non è stata osservata alcuna crescita nei tre monitoraggi effettuati, mentre per quanto riguarda le colture a 30°C è stata osservata crescita solamente all'interno di una replica (Coltura 3). È sorto il dubbio che le colture non fossero sopravvissute all'inoculo e si è deciso di testarne la vitalità attraverso semina diretta in Agar Sangue (AS). Sono state utilizzate due piastre di AS divise in cinque settori (uno per coltura). Le due piastre sono state incubate capovolte a 30°C e dopo 24 ore si è osservata crescita in tutti i settori, confermando la presenza di cellule vitali all'interno di ciascuna Falcon. Visti i risultati raccolti, si è iniziato a sospettare concretamente che fossero presenti batteri contaminanti all'interno delle dieci colture. Per verificare ulteriormente l'effettiva presenza di *L. monocytogenes* all'interno delle dieci colture, è stata effettuata una PCR real-time che ha confermato il sospetto. La PCR real-time è stata effettuata a partire dagli estratti delle dieci colture ottenuti il primo giorno di monitoraggio (6 luglio) e da tutti gli estratti ottenuti il tredicesimo giorno (18 luglio), in modo tale da poter eseguire un confronto. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

| | 4°C | | 30°C | |
|------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| | 6 luglio | 18 luglio | 6 luglio | 18 luglio |
| Coltura 1 | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| Coltura 2 | Negativo | Negativo | Positivo | Negativo |
| Coltura 3 | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| Coltura 4 | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| Coltura 5 | Negativo | Positivo | Negativo | Negativo |

Tabella 8.3. Risultati della PCR real-time per le cinque colture di Lm246 poste a 4°C (a sinistra) e per le cinque colture di Lm 246 poste a 30°C (a destra) (confronto tra due punti temporali)

È interessante notare come la PCR real-time abbia restituito positività a *L. monocytogenes* in entrambe le date solamente per la coltura numero 3 incubata a 30°C, per la quale era stata osservata crescita anche nel terreno selettivo. Nel caso delle altre colture, invece, è possibile notare l'assenza di *L. monocytogenes* in entrambe le date testate o la presenza di *L. monocytogenes* solamente in una delle due date. Quest'ultimo caso sta probabilmente ad indicare la presenza del patogeno in quantità molto ridotte all'interno delle Falcon. Il patogeno, inoltre, probabilmente è presente all'interno di queste Falcon in uno stato non vitale.

In seguito a queste osservazioni attraverso le quali è possibile dichiarare con quasi assoluta certezza la presenza di batteri contaminanti, si è scelto di interrompere il monitoraggio attraverso la conta su piastra in ALOA.

***Listeria monocytogenes* 113**

Per quanto riguarda il ceppo Lm113, si è scelto di monitorare l'andamento delle cinque colture poste a 4°C attraverso la conta su piastra in ALOA, effettuata secondo le tempistiche riportate precedentemente in Tabella 7. Nella tabella seguente sono riportati tutti i risultati ottenuti nel corso delle 12 settimane di esperimento.

| <i>Lm113</i> – 4°C | | | | | | | | | |
|--------------------|---|----------------------------|----|------------------------|-----------|----------------------------|----|------------------------|-----|
| Coltura 1 | | | | | Coltura 2 | | | | |
| | | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | | -4 | -5 | | | -4 | -5 | | |
| S1 | 1 | 96 | 4 | 9.09 x 10 ⁶ | 7.0 | 89 | 6 | 8.64 x 10 ⁶ | 6.9 |
| | 2 | 47 | 2 | 4.45 x 10 ⁶ | 6.6 | 75 | 7 | 7.45 x 10 ⁶ | 6.9 |
| | 3 | 54 | 1 | 5.00 x 10 ⁶ | 6.7 | 87 | 6 | 8.45 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S2 | 1 | 71 | 9 | 7.27 x 10 ⁶ | 6.9 | 93 | 7 | 9.09 x 10 ⁶ | 7.0 |
| | 2 | 74 | 6 | 7.27 x 10 ⁶ | 6.9 | 49 | 3 | 4.73 x 10 ⁶ | 6.7 |
| S3 | | 71 | 6 | 7.00 x 10 ⁶ | 6.8 | 60 | 8 | 6.18 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S4 | | 117 | 14 | 1.19 x 10 ⁷ | 7.1 | 58 | 9 | 6.09 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S5 | | 47 | 2 | 4.45 x 10 ⁶ | 6.6 | 53 | 4 | 5.18 x 10 ⁶ | 6.7 |
| S6 | | 39 | 5 | 4.00 x 10 ⁶ | 6.6 | 22 | 4 | 2.36 x 10 ⁶ | 6.4 |
| S7 | | 48 | 4 | 4.73 x 10 ⁶ | 6.7 | 25 | 2 | 2.45 x 10 ⁶ | 6.4 |
| S8 | | 22 | 8 | 2.73 x 10 ⁶ | 6.4 | 32 | 6 | 3.45 x 10 ⁶ | 6.5 |
| S9 | | 32 | 2 | 3.09 x 10 ⁶ | 6.5 | 34 | 1 | 3.18 x 10 ⁶ | 6.5 |
| S10 | | 19 | 1 | 1.82 x 10 ⁶ | 6.3 | 40 | 0 | 3.64 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S11 | | 55 | 2 | 5.18 x 10 ⁶ | 6.7 | 15 | 1 | 1.45 x 10 ⁶ | 6.2 |
| S12 | | 37 | 4 | 3.73 x 10 ⁶ | 6.6 | 29 | 5 | 3.09 x 10 ⁶ | 6.5 |

| Coltura 3 | | | | | Coltura 4 | | | | |
|-----------|---|----------------------------|----|------------------------|-----------|----------------------------|----|------------------------|-----|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | | -4 | -5 | | | -4 | -5 | | |
| S1 | 1 | 71 | 10 | 7.36 x 10 ⁶ | 6.9 | 88 | 13 | 9.18 x 10 ⁶ | 7.0 |
| | 2 | 61 | 2 | 5.73 x 10 ⁶ | 6.8 | 58 | 9 | 6.09 x 10 ⁶ | 6.8 |
| | 3 | 119 | 9 | 1.16 x 10 ⁷ | 7.1 | 85 | 7 | 8.36 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S2 | 1 | 54 | 6 | 5.45 x 10 ⁶ | 6.7 | 45 | 7 | 4.73 x 10 ⁶ | 6.7 |
| | 2 | 80 | 8 | 8.00 x 10 ⁶ | 6.9 | 85 | 14 | 9.00 x 10 ⁶ | 7.0 |
| S3 | | 71 | 7 | 7.09 x 10 ⁶ | 6.9 | 97 | 10 | 9.73 x 10 ⁶ | 7.0 |
| S4 | | 82 | 9 | 8.27 x 10 ⁶ | 6.9 | 64 | 12 | 6.91 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S5 | | 61 | 9 | 6.36 x 10 ⁶ | 6.8 | 34 | 8 | 3.82 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S6 | | 41 | 5 | 4.18 x 10 ⁶ | 6.6 | 68 | 8 | 6.91 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S7 | | 44 | 4 | 4.36 x 10 ⁶ | 6.6 | 40 | 0 | 3.64 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S8 | | 62 | 5 | 6.09 x 10 ⁶ | 6.8 | 54 | 3 | 5.18 x 10 ⁶ | 6.7 |

| | | | | | | | | |
|------------|----|---|------------------------|-----|----|----|------------------------|-----|
| S9 | 25 | 1 | 2.36 x 10 ⁶ | 6.4 | 40 | 11 | 4.64 x 10 ⁶ | 6.7 |
| S10 | 24 | 4 | 2.55 x 10 ⁶ | 6.4 | 22 | 2 | 2.18 x 10 ⁶ | 6.3 |
| S11 | 34 | 4 | 3.45 x 10 ⁶ | 6.5 | 19 | 4 | 2.09 x 10 ⁶ | 6.3 |
| S12 | 73 | 7 | 7.27 x 10 ⁶ | 6.9 | 24 | 2 | 2.36 x 10 ⁶ | 6.4 |

| Coltura 5 | | | | | |
|------------------|----------|-----------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | | -4 | -5 | | |
| S1 | 1 | 76 | 9 | 7.73 x 10 ⁶ | 6.9 |
| | 2 | 84 | 7 | 8.27 x 10 ⁶ | 6.9 |
| | 3 | 61 | 4 | 5.91 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S2 | 1 | 71 | 9 | 7.27 x 10 ⁶ | 6.9 |
| | 2 | 76 | 3 | 7.18 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S3 | | 78 | 5 | 7.55 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S4 | | 63 | 6 | 6.27 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S5 | | 40 | 5 | 4.09 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S6 | | 45 | 2 | 4.27 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S7 | | 24 | 6 | 2.73 x 10 ⁶ | 6.4 |
| S8 | | 35 | 1 | 3.27 x 10 ⁶ | 6.5 |
| S9 | | 55 | 10 | 5.91 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S10 | | 27 | 5 | 2.91 x 10 ⁶ | 6.5 |
| S11 | | 18 | 2 | 1.82 x 10 ⁶ | 6.3 |
| S12 | | 36 | 7 | 3.91 x 10 ⁶ | 6.6 |

Tabella 9.1. Risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA per le cinque colture di *Lm113* poste a 4°C nel corso delle 12 settimane di esperimento

I dati relativi alle colture di *Lm113* poste a 4°C sono stati ottenuti interamente attraverso conta su piastra in ALOA per tutte e 12 le settimane. Non è stato necessario ricorrere all'utilizzo di PCA (terreno non selettivo) dopo qualche settimana di esperimento, perché si è continuato ad osservare crescita di colonie riconducibili a *Listeria monocytogenes* in ALOA. Dopo qualche settimana di monitoraggio, l'unico accorgimento che è stato adottato è stato lasciare le piastre ad incubare a 30°C per 72-96 ore (anziché 48 ore): dopo le sole 48 ore, infatti, le colonie in ALOA apparivano ancora molto piccole e spesso difficili da vedere e contare. Solamente alla terza settimana di monitoraggio è stata eseguita una prova di conta

su piastra anche in PCA, in modo tale da poter confrontare il risultato ottenuto con la stessa conta eseguita in ALOA. Si riporta in seguito il confronto in questione.

| <i>Lm113</i> – 4°C (settimana 3) | | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| ALOA | | | | | PCA | | | |
| | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | -4 | -5 | | | -5 | -6 | | |
| Coltura1 | 71 | 6 | 7.00 x 10 ⁶ | 6.8 | 61 | 8 | 6.27 x 10 ⁶ | 6.8 |
| Coltura2 | 60 | 8 | 6.18 x 10 ⁶ | 6.8 | 77 | 8 | 7.73 x 10 ⁶ | 6.9 |
| Coltura3 | 71 | 7 | 7.09 x 10 ⁶ | 6.9 | 59 | 13 | 6.55 x 10 ⁶ | 6.8 |
| Coltura4 | 97 | 10 | 9.73 x 10 ⁶ | 7.0 | 73 | 11 | 7.64 x 10 ⁶ | 6.9 |
| Coltura5 | 78 | 5 | 7.55 x 10 ⁶ | 6.9 | 43 | 7 | 4.55 x 10 ⁶ | 6.7 |

Tabella 9.2. Confronto dei risultati ottenuti durante il monitoraggio della terza settimana di esperimento, comparando la conta su piastra in ALOA (a sinistra) e la conta su piastra in PCA (a destra)

I risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA e alla conta su piastra in PCA sono praticamente analoghi, come è possibile vedere nella tabella appena riportata. In seguito a questa osservazione, quindi, come già anticipato in precedenza, si è deciso di continuare il monitoraggio nelle settimane successive ricorrendo unicamente alla conta in ALOA. Nonostante le cellule di *Listeria monocytogenes* in esame fossero potenzialmente stressate a causa delle basse temperature e della carenza di nutrienti, queste hanno continuato a crescere senza particolari problemi su un terreno selettivo come l'ALOA, senza la necessità di ricorrere ad un terreno più permissivo e non selettivo come il PCA.

Si riporta ora un grafico riassuntivo dei dati riportati in *Tabella 9.1*. Questo grafico consente di visualizzare l'andamento delle colture di *Lm113* all'interno delle cinque Falcon poste a 4°C nel corso delle 12 settimane di esperimento. Sull'asse delle ascisse sono riportati i giorni in cui sono state eseguite le conte su piastra, mentre sull'asse delle ordinate è riportato il valore log (logaritmo in base 10 di N).

Listeria monocytogenes 113 (4°C)

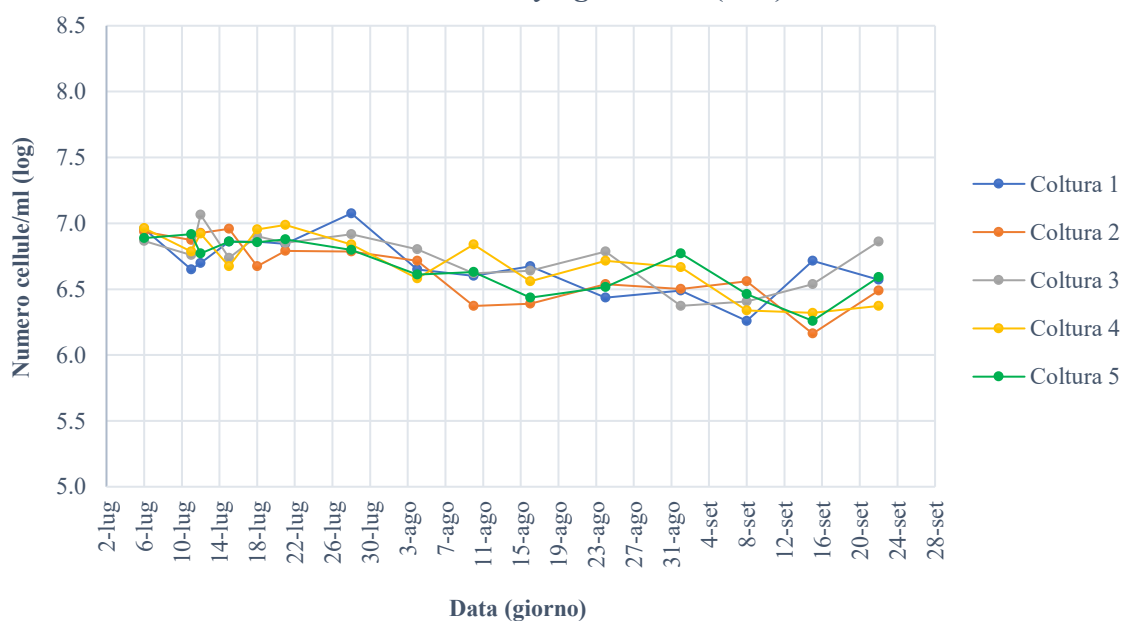


Grafico 4. Andamento delle cinque colture di *Lm113* poste a 4°C nel corso delle 12 settimane di esperimento (conta su piastra in ALOA)

Vediamo ora, invece, i risultati ottenuti mediante la conta su piastra per le cinque colture di *Lm113* poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento. Il monitoraggio è stato eseguito anche in questo caso rispettando le tempistiche indicate in *Tabella 7*. Inizialmente è stata eseguita una conta su piastra in ALOA. A partire dalla terza settimana, poiché si osservava un progressivo calo nelle conte, è stata effettuata sia la conta in ALOA che la conta in PCA, poiché si sospettava che le cellule stressate potessero far fatica a crescere su un terreno selettivo come l'ALOA. A partire dalla quinta settimana, si è deciso di continuare la conta esclusivamente su PCA, non riuscendo più ad osservare alcuna crescita in ALOA. Nella tabella seguente sono riportati tutti i risultati ottenuti nel corso delle 12 settimane di esperimento. Sono evidenziate in grigio chiaro le righe della tabella relative alla conta su PCA, mentre sono state mantenute con sfondo bianco le righe relative alla conta su ALOA.

| <i>Lm113</i> – 30°C | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|---|------------------------|----------------|-----|
| Coltura 1 | | | | | | | | | | |
| Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | | | |
| S1 | 1 | – | – | – | 63 | 5 | – | 6.18 x 10 ⁶ | 6.8 | |
| | 2 | – | – | – | 10 | 5 | – | 1.36 x 10 ⁶ | 6.1 | |
| | 3 | – | – | – | 13 | 0 | – | 1.18 x 10 ⁶ | 6.1 | |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|----------|---|---|----|----|---|---|---|--------------------|-----|
| S2 | 1 | - | - | - | 35 | 8 | - | - | 3.91×10^6 | 5.6 |
| | 2 | - | - | - | 29 | 2 | - | - | 2.82×10^5 | 5.4 |
| S3 (ALOA) | | - | - | 62 | 5 | - | - | - | 6.09×10^4 | 4.8 |
| S3 (PCA) | | - | - | - | - | - | 1 | 0 | 9.09×10^4 | 5.0 |
| S4 | 1 (ALOA) | - | - | 0 | 0 | - | - | - | 0 | - |
| | 1 (PCA) | - | - | - | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| | 2 (ALOA) | 0 | - | - | - | - | - | - | 0 | - |
| | 2 (PCA) | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | 0 | - |

| | | Coltura 2 | | | | | | | | |
|-----------|----------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|--------------------|-----|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | - | - | - | - | 83 | 7 | - | 8.18×10^6 | 6.9 |
| | 2 | - | - | - | - | 20 | 1 | - | 1.91×10^6 | 6.3 |
| | 3 | - | - | - | - | 13 | 1 | - | 1.27×10^6 | 6.1 |
| S2 | 1 | - | - | - | 89 | 9 | - | - | 8.91×10^5 | 5.9 |
| | 2 | - | - | - | 11 | 0 | - | - | 1.00×10^5 | 5.0 |
| S3 (ALOA) | | - | - | 18 | 4 | - | - | - | 2.00×10^4 | 4.3 |
| S3 (PCA) | | - | - | - | - | - | 2 | 0 | 1.82×10^5 | 5.3 |
| S4 | 1 (ALOA) | - | - | 0 | 0 | - | - | - | 0 | - |
| | 1 (PCA) | - | - | - | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| | 2 (ALOA) | 0 | - | - | - | - | - | - | 0 | - |
| | 2 (PCA) | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | 0 | - |

| | | Coltura 3 | | | | | | | | |
|----|---|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|--------------------|-----|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | - | - | - | - | 53 | 5 | - | 5.27×10^6 | 6.7 |
| | 2 | - | - | - | - | 7 | 0 | - | 6.36×10^5 | 5.8 |
| | 3 | - | - | - | - | 17 | 2 | - | 1.73×10^6 | 6.2 |
| S2 | 1 | - | - | - | 59 | 6 | - | - | 5.91×10^5 | 5.8 |

| | | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------|-------|------|------|-----|----|---|---|--------------------|-----|
| | 2 | - | - | - | 11 | 2 | - | - | 1.18×10^5 | 5.1 |
| S3 (ALOA) | | - | - | 45 | 1 | - | - | - | 4.18×10^4 | 4.6 |
| S3 (PCA) | | - | - | - | - | - | 9 | 0 | 8.18×10^5 | 5.9 |
| S4 | 1 (ALOA) | - | - | 0 | 0 | - | - | - | 0 | - |
| | 1 (PCA) | - | - | - | 133 | 23 | - | - | 1.42×10^5 | 5.2 |
| | 2 (ALOA) | 0 | - | - | - | - | - | - | 0 | - |
| | 2 (PCA) | >300 | >300 | >300 | 94 | - | - | - | 9.40×10^4 | 5.0 |
| S5 | | - | - | - | 6 | 0 | - | - | 5.45×10^3 | 3.7 |
| S6 | | - | 335 | 23 | - | - | - | - | 3.25×10^3 | 3.5 |
| S7 | | - | 1636 | 572 | - | - | - | - | 2.01×10^4 | 4.3 |
| S8 | | - | - | - | 6 | 1 | - | - | 6.36×10^3 | 3.8 |
| S9 | | - | 6 | 1 | - | - | - | - | 6.36×10^1 | 1.8 |
| S10 | | >1200 | 1200 | - | - | - | - | - | 1.09×10^4 | 4.0 |
| S11 | | - | - | >300 | 105 | 14 | - | - | 1.08×10^5 | 5.0 |
| S12 | | - | - | 175 | 19 | 3 | - | - | 1.76×10^4 | 4.2 |

| | | Coltura 4 | | | | | | | | | |
|------------------|-----------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|--|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log | |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | | |
| S1 | 1 | - | - | - | - | 46 | 7 | - | 4.82×10^6 | 6.7 | |
| | 2 | - | - | - | - | 9 | 2 | - | 1.00×10^6 | 6.0 | |
| | 3 | - | - | - | - | 16 | 2 | - | 1.64×10^6 | 6.2 | |
| S2 | 1 | - | - | - | 77 | 4 | - | - | 7.36×10^5 | 5.9 | |
| | 2 | - | - | - | 12 | 0 | - | - | 1.09×10^5 | 5.0 | |
| S3 (ALOA) | | - | - | 21 | 3 | - | - | - | 2.18×10^4 | 4.3 | |
| S3 (PCA) | | - | - | - | - | - | 3 | 0 | 2.73×10^5 | 5.4 | |
| S4 | 1 (ALOA) | - | - | 0 | 0 | - | - | - | 0 | - | |
| | 1 (PCA) | - | - | - | 0 | 0 | - | - | 0 | - | |
| | 2 (ALOA) | 0 | - | - | - | - | - | - | 0 | - | |
| | 2 (PCA) | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | 0 | - | |

| | | Coltura 5 | | | | | | | | |
|-----------|----------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----------------|------------------------|-----|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | N (cell/ml) | log | |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | | | -6 |
| S1 | 1 | – | – | – | – | 46 | 4 | – | 4.55 x 10 ⁶ | 6.7 |
| | 2 | – | – | – | – | 9 | 0 | – | 8.18 x 10 ⁵ | 5.9 |
| | 3 | – | – | – | – | 3 | 4 | – | 6.36 x 10 ⁵ | 5.8 |
| S2 | 1 | – | – | – | 40 | 5 | – | – | 4.09 x 10 ⁵ | 5.6 |
| | 2 | – | – | – | 5 | 1 | – | – | 5.45 x 10 ⁴ | 4.7 |
| S3 (ALOA) | | – | – | 7 | 1 | – | – | – | 7.27 x 10 ³ | 3.9 |
| S3 (PCA) | | – | – | – | – | – | 1 | 0 | 9.09 x 10 ⁴ | 5.0 |
| S4 | 1 (ALOA) | – | – | 0 | 0 | – | – | – | 0 | – |
| | 1 (PCA) | – | – | – | 41 | 4 | – | – | 4.09 x 10 ⁴ | 4.6 |
| | 2 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 2 (PCA) | 260 | 21 | 1 | 0 | – | – | – | 2.00 x 10 ² | 2.3 |
| S5 | | 77 | 4 | – | – | – | – | – | 7.36 x 10 ¹ | 1.9 |
| S6 | | 5 | 0 | – | – | – | – | – | 4.55 | 0.7 |
| S7 | | 9 | 0 | – | – | – | – | – | 8.18 | 0.9 |
| S8 | | 0 | 0 | – | – | – | – | – | 0 | – |
| S9 | | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |

Tabella 9.3. Risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA e PCA per le cinque colture di *Lm113* poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento

Come è possibile notare nelle tabelle appena riportate relative ai risultati della conta su piastra per le cinque colture di *Lm113* poste a 30°C, solamente in una coltura su cinque è stato possibile osservare crescita per tutte e 12 le settimane di esperimento. La coltura numero 3, infatti, ha continuato a presentare crescita su PCA fino all'ultimo monitoraggio della dodicesima settimana. Al contrario, per la coltura numero 5 le conte su PCA si sono azzerate all'ottava settimana, mentre per le colture numero 1, 2 e 4 le conte su PCA si sono azzerate già alla quarta settimana. In corrispondenza della quarta settimana (quando le conte della maggior parte delle colture si sono azzerate), si è deciso di eseguire un secondo monitoraggio a qualche giorno di distanza dal primo in modo tale da avere maggiori sicurezze riguardo l'effettivo azzeramento di queste conte. Dopo aver ottenuto questa conferma, per le colture

numero 1, 2 e 4 si è deciso di interrompere il monitoraggio. Lo stesso ragionamento è stato fatto anche per la coltura numero 5 alla nona settimana.

Come fatto anche in precedenza per le colture poste a 4°C, si riporta ora un grafico riassuntivo dei dati presenti in *Tabella 9.3*. Il grafico consente di visualizzare l'andamento delle colture di *Lm113* all'interno delle cinque Falcon poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento. Sull'asse delle ascisse si riportano i giorni in cui sono state eseguite le conte su piastra, mentre sull'asse delle ordinate si riporta il valore log (logaritmo in base 10 di N). Per i punti temporali in cui è stata eseguita in contemporanea sia la conta su piastra in ALOA che la conta su piastra in PCA si è deciso tener conto all'interno del grafico unicamente del valore di log ottenuto attraverso la conta su ALOA (dove non nullo). In corrispondenza di questi punti, infatti, è possibile che la conta su PCA non sia così attendibile avendo scelto delle diluizioni troppo elevate. Nei punti successivi, invece, si è tenuto conto unicamente della conta su PCA (essendosi azzerate le conte su ALOA).

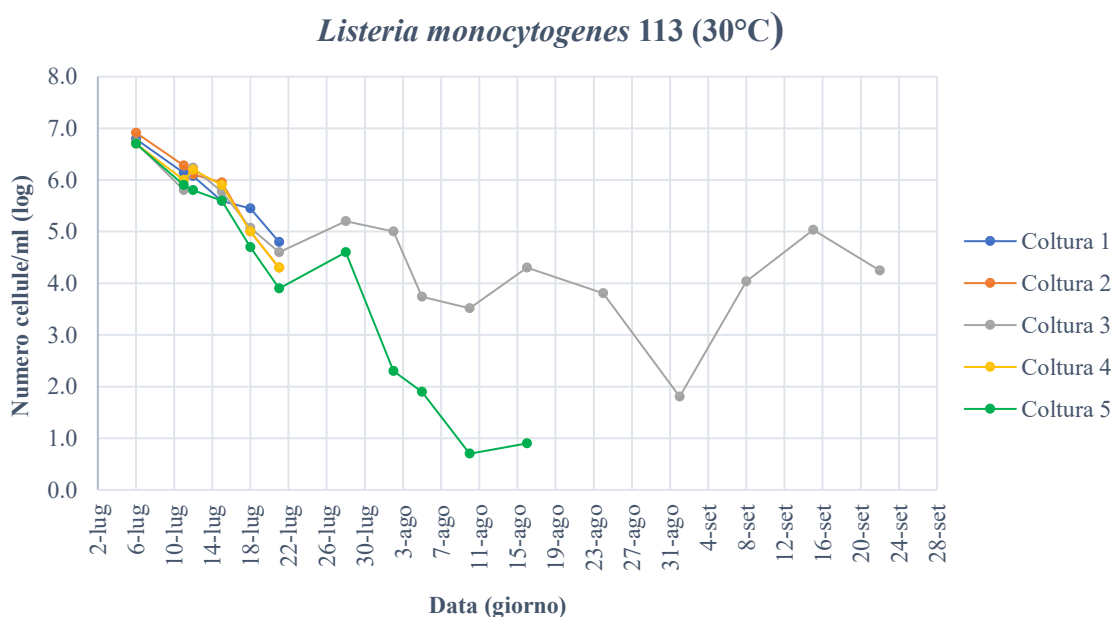


Grafico 5. Andamento delle cinque colture di *Lm113* poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento (conta su piastra in ALOA e poi in PCA a partire dal 21 luglio 2022)

A questo punto è stato costruito un ulteriore grafico che racchiude tutte le informazioni raccolte fino a questo momento attraverso le conte su piastra per il ceppo *Lm113*. In particolare, all'interno del grafico possiamo vedere due linee che rappresentano l'andamento complessivo delle cinque colture di *Lm113* incubate a 4°C (in azzurro) e delle cinque colture incubate a 30°C (in rosa). Quello che è stato fatto è stata una media tra i vari valori log ottenuti dalle cinque colture (prima per quelle a 4°C e poi per quelle a 30°C) per ogni punto temporale. A

questo valore log finale per ogni punto temporale è stato associato un errore, corrispondente alla deviazione standard rispetto alla media.

Si riporta in seguito il grafico in questione e subito a seguire una tabella che riepiloga tutti i dati che sono stati utili alla costruzione del grafico stesso. Sull'asse delle ascisse, come nei grafici precedenti, è riportato il tempo (quindi i giorni in cui sono stati effettuati i monitoraggi), mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori medi di log.

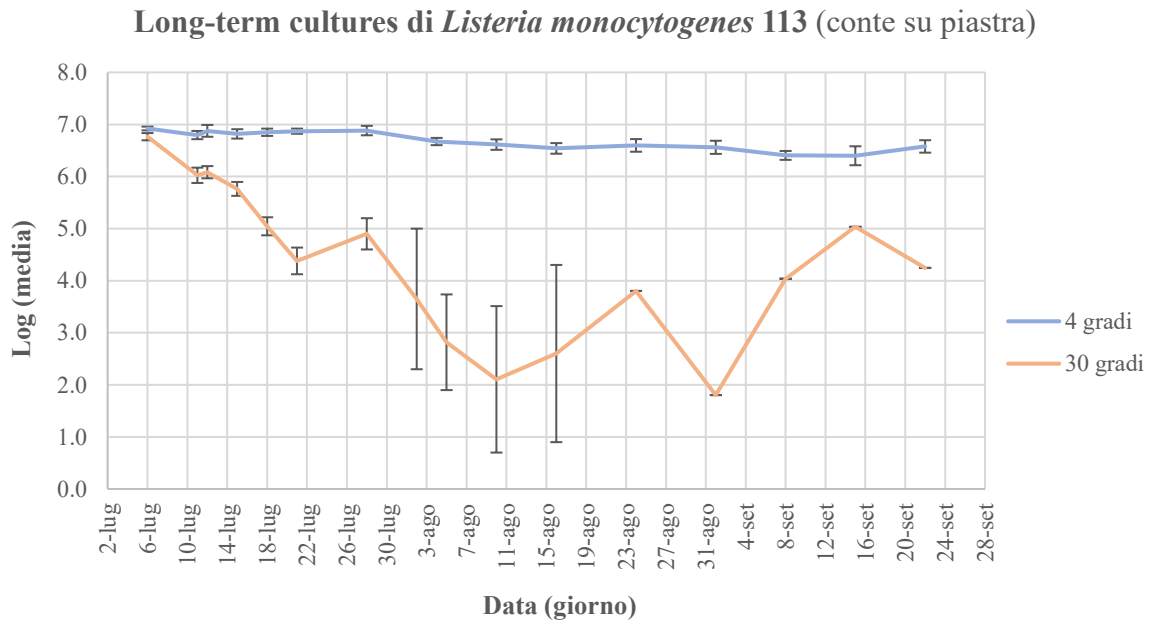


Grafico 6. Andamento complessivo delle cinque culture di *Lm113* poste a 30°C (in rosa) e delle cinque colture di *Lm113* poste a 4°C (in azzurro) nel corso delle 12 settimane di esperimento

| | | <i>Lm113</i> | | | |
|----|---|--------------|---------------|-------------|---------------|
| | | 4 gradi | | 30 gradi | |
| | | Log (media) | Dev. standard | Log (media) | Dev. standard |
| S1 | 1 | 6.9 | 0.036 | 6.8 | 0.069 |
| | 2 | 6.8 | 0.079 | 6.0 | 0.147 |
| | 3 | 6.9 | 0.114 | 6.1 | 0.117 |
| S2 | 1 | 6.8 | 0.090 | 5.8 | 0.133 |
| | 2 | 6.8 | 0.070 | 5.0 | 0.173 |
| S3 | | 6.9 | 0.050 | 4.4 | 0.256 |
| S4 | 1 | 6.9 | 0.091 | 4.9 | 0.300 |
| | 2 | – | – | 3.7 | 1.350 |
| S5 | | 6.7 | 0.070 | 2.8 | 0.918 |

| | | | | |
|------------|-----|-------|-----|-------|
| S6 | 6.6 | 0.100 | 2.1 | 1.406 |
| S7 | 6.5 | 0.102 | 2.6 | 1.701 |
| S8 | 6.6 | 0.122 | 3.8 | 0 |
| S9 | 6.6 | 0.126 | 1.8 | 0 |
| S10 | 6.4 | 0.085 | 4.0 | 0 |
| S11 | 6.4 | 0.182 | 5.0 | 0 |
| S12 | 6.6 | 0.119 | 4.2 | 0 |

Tabella 10. Tabella riassuntiva dei dati ottenuti dal monitoraggio di *Lm113* a 4°C (a sinistra) e a 30°C (a destra) attraverso conta su piastra

***Listeria monocytogenes* 19111**

Come nel caso del ceppo *Lm113*, anche per il ceppo *Lm19111* si è scelto di monitorare l'andamento delle cinque colture poste a 4°C attraverso la conta su piastra in ALOA. I monitoraggi sono stati eseguiti come di consueto secondo le tempistiche riportate nella *Tabella 7*. Viene riportata ora una tabella contenente tutti i risultati ottenuti nel corso delle 12 settimane di esperimento relativi alla conta su piastra in ALOA.

| <i>Lm19111</i> – 4°C | | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | | Coltura 1 | | | | Coltura 2 | | | |
| | | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | | -4 | -5 | | | -4 | -5 | | |
| S1 | 1 | 103 | 8 | 1.01 x 10 ⁷ | 7.0 | 101 | 12 | 1.03 x 10 ⁷ | 7.0 |
| | 2 | 65 | 4 | 6.27 x 10 ⁶ | 6.8 | 38 | 6 | 4.00 x 10 ⁶ | 6.6 |
| | 3 | 121 | 16 | 1.25 x 10 ⁷ | 7.1 | 87 | 10 | 8.82 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S2 | 1 | 179 | 80 | 2.35 x 10 ⁷ | 7.4 | 80 | 13 | 8.45 x 10 ⁶ | 6.9 |
| | 2 | 102 | 15 | 1.06 x 10 ⁷ | 7.0 | 90 | 15 | 9.55 x 10 ⁶ | 7.0 |
| S3 | | 186 | 23 | 1.90 x 10 ⁷ | 7.3 | 118 | 13 | 1.19 x 10 ⁷ | 7.1 |
| S4 | | 83 | 12 | 8.64 x 10 ⁶ | 6.9 | 97 | 8 | 9.55 x 10 ⁶ | 7.0 |
| S5 | | 83 | 6 | 8.09 x 10 ⁶ | 6.9 | 86 | 8 | 8.55 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S6 | | 110 | 20 | 1.18 x 10 ⁷ | 7.1 | 122 | 11 | 1.21 x 10 ⁷ | 7.1 |
| S7 | | 108 | 6 | 1.04 x 10 ⁷ | 7.0 | 76 | 16 | 8.36 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S8 | | 193 | 17 | 1.91 x 10 ⁷ | 7.3 | 47 | 9 | 5.09 x 10 ⁶ | 6.7 |
| S9 | | 88 | 9 | 8.82 x 10 ⁶ | 6.9 | 54 | 5 | 5.36 x 10 ⁶ | 6.7 |
| S10 | | 43 | 5 | 4.36 x 10 ⁶ | 6.6 | 33 | 3 | 3.27 x 10 ⁶ | 6.5 |

| | | | | | | | | |
|------------|----|---|--------------------|-----|----|---|--------------------|-----|
| S11 | 19 | 1 | 1.82×10^6 | 6.3 | 76 | 8 | 7.64×10^6 | 6.9 |
| S12 | 52 | 4 | 5.09×10^6 | 6.7 | 41 | 9 | 4.55×10^6 | 6.7 |

| | | Coltura 3 | | | | Coltura 4 | | | |
|------------|----------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | | -4 | -5 | | | -4 | -5 | | |
| S1 | 1 | 116 | 18 | 1.22×10^7 | 7.1 | 175 | 16 | 1.74×10^7 | 7.2 |
| | 2 | 116 | 9 | 1.14×10^7 | 7.1 | 63 | 4 | 6.09×10^6 | 6.8 |
| | 3 | 152 | 8 | 1.45×10^7 | 7.2 | 100 | 12 | 1.02×10^7 | 7.0 |
| S2 | 1 | 79 | 8 | 7.91×10^6 | 6.9 | 141 | 10 | 1.37×10^7 | 7.1 |
| | 2 | 104 | 8 | 1.02×10^7 | 7.0 | 134 | 15 | 1.35×10^7 | 7.1 |
| S3 | | 155 | 15 | 1.55×10^7 | 7.2 | 132 | 14 | 1.33×10^7 | 7.1 |
| S4 | | 92 | 6 | 1.20×10^7 | 7.1 | 123 | 5 | 1.16×10^7 | 7.1 |
| S5 | | 125 | 7 | 9.45×10^6 | 7.0 | 89 | 6 | 8.64×10^6 | 6.9 |
| S6 | | 94 | 10 | 6.00×10^6 | 6.8 | 118 | 11 | 1.17×10^7 | 7.1 |
| S7 | | 59 | 7 | 1.28×10^7 | 7.1 | 58 | 10 | 6.18×10^6 | 6.8 |
| S8 | | 125 | 16 | 8.45×10^6 | 6.9 | 88 | 12 | 9.09×10^6 | 7.0 |
| S9 | | 76 | 17 | 8.27×10^6 | 6.9 | 31 | 4 | 3.18×10^6 | 6.5 |
| S10 | | 80 | 11 | 6.73×10^6 | 6.8 | 59 | 10 | 6.27×10^6 | 6.8 |
| S11 | | 67 | 7 | 4.36×10^6 | 6.6 | 69 | 6 | 6.82×10^6 | 6.8 |
| S12 | | 43 | 5 | 1.20×10^7 | 7.1 | 27 | 0 | 2.45×10^6 | 6.4 |

| | | Coltura 5 | | | |
|-----------|----------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | | -4 | -5 | | |
| S1 | 1 | 138 | 4 | 1.29×10^7 | 7.1 |
| | 2 | 84 | 9 | 8.45×10^6 | 6.9 |
| | 3 | 104 | 23 | 1.15×10^7 | 7.1 |
| S2 | 1 | 113 | 9 | 1.11×10^7 | 7.0 |
| | 2 | 140 | 9 | 1.35×10^7 | 7.1 |
| S3 | | 105 | 11 | 1.05×10^7 | 7.0 |
| S4 | | 93 | 17 | 1.00×10^7 | 7.0 |
| S5 | | 102 | 7 | 9.91×10^6 | 7.0 |
| S6 | | 173 | 20 | 1.75×10^7 | 7.2 |

| | | | | |
|------------|----|----|------------------------|-----|
| S7 | 86 | 8 | 8.55 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S8 | 82 | 9 | 8.27 x 10 ⁶ | 6.9 |
| S9 | 61 | 11 | 6.55 x 10 ⁶ | 6.8 |
| S10 | 37 | 8 | 4.09 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S11 | 52 | 5 | 5.18 x 10 ⁶ | 6.7 |
| S12 | 19 | 3 | 2.00 x 10 ⁶ | 6.3 |

Tabella 11.1. Risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA per le cinque colture di *Lm19111* poste a 4°C nel corso delle 12 settimane di esperimento

Anche in questo caso, come per il ceppo precedente, le conte sono state eseguite interamente in ALOA durante le 12 settimane di esperimento e non è stato necessario ricorrere al PCA dopo qualche settimana. Analogamente a quanto visto per *Lm113*, l'unico accorgimento che è stato adottato è stato quello di mantenere le piastre in incubatore a 30°C per 72-96 ore (anziché 48 ore) dopo le prime settimane di esperimento, in modo tale da permettere la crescita su ALOA anche delle cellule di *Listeria monocytogenes* più stressate. In ogni caso, anche per le colture del ceppo *Lm19111* poste a 4°C è stata eseguita una prova di conta su piastra anche in PCA in corrispondenza della terza settimana di esperimento, per poter fare un confronto con la conta su ALOA. Si riporta nella tabella seguente quanto ottenuto.

| | <i>Lm19111</i> – 4°C (settimana 3) | | | | | | | |
|-----------------|---|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | ALOA | | | | PCA | | | |
| | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. colonie) | | N (cell/ml) | log |
| | -4 | -5 | | | -5 | -6 | | |
| Coltura1 | 186 | 23 | 1.90 x 10 ⁷ | 7.3 | 213 | 13 | 2.05 x 10 ⁷ | 7.3 |
| Coltura2 | 118 | 13 | 1.19 x 10 ⁷ | 7.1 | 143 | 8 | 1.37 x 10 ⁷ | 7.1 |
| Coltura3 | 155 | 15 | 1.55 x 10 ⁷ | 7.2 | 109 | 17 | 1.15 x 10 ⁷ | 7.1 |
| Coltura4 | 132 | 14 | 1.33 x 10 ⁷ | 7.1 | 102 | 12 | 1.04 x 10 ⁷ | 7.0 |
| Coltura5 | 105 | 11 | 1.05 x 10 ⁷ | 7.0 | 95 | 7 | 9.27 x 10 ⁶ | 7.0 |

Tabella 11.2. Confronto dei risultati ottenuti durante il monitoraggio della terza settimana di esperimento, comparando la conta su piastra in ALOA (a sinistra) e la conta su piastra in PCA (a destra)

Come è possibile notare dalla *Tabella 11.2*, i risultati ottenuti dalle due conte (ALOA e PCA) sono praticamente analoghi nell'ambito della stessa coltura. Si è deciso, quindi, di continuare il monitoraggio unicamente in ALOA nelle settimane successive di esperimento.

Viene riportato in seguito il grafico riassuntivo dei dati riportati in *Tabella 11.1*. Il grafico consente di visualizzare l'andamento delle colture di *Lm19111* all'interno delle cinque Falcon poste a 4°C nel corso delle 12 settimane di osservazione. Vengono riportati sull'asse delle ascisse i giorni in cui sono state effettuate le conte su piastra in ALOA e sull'asse delle ordinate i valori di log (logaritmo in base 10 di N).

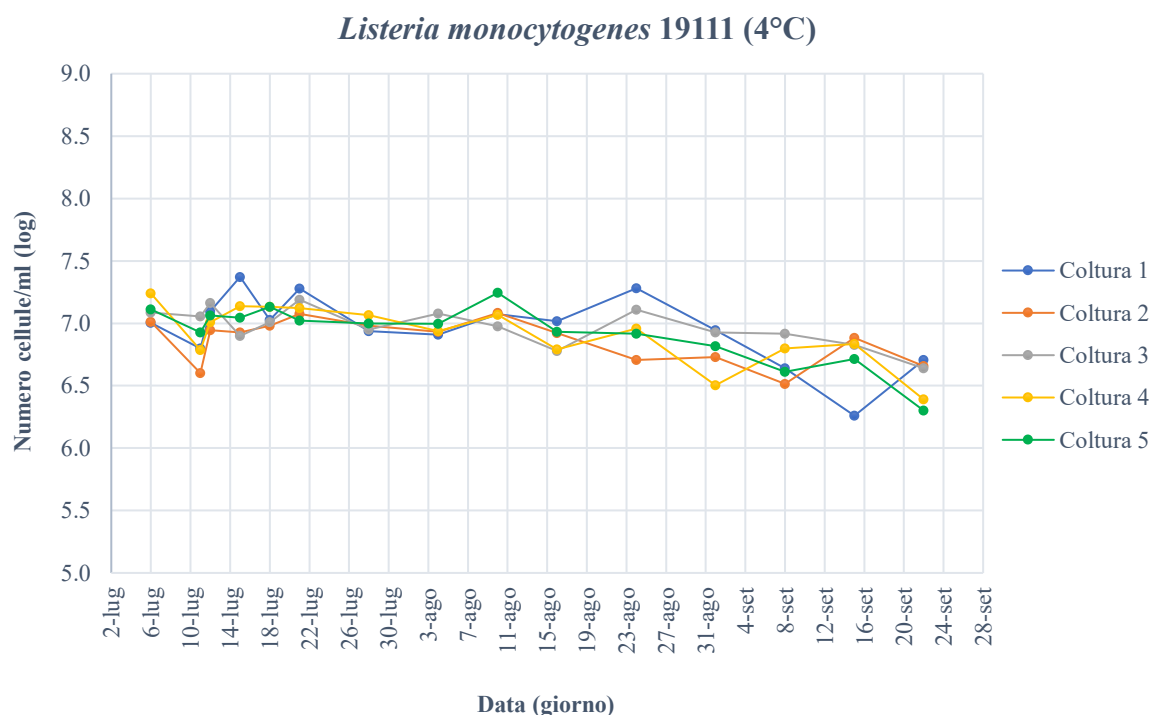


Grafico 7. Andamento delle cinque colture di *Lm19111* poste a 4°C nel corso delle 12 settimane di esperimento (conta su piastra in ALOA)

Vengono riportati ora i risultati ottenuti mediante la conta su piastra per le cinque colture di *Lm19111* poste a 30°C durante le 12 settimane di esperimento. Per i monitoraggi sono state rispettate le tempistiche indicate nella *Tabella 7*, eseguendo inizialmente una conta su piastra in ALOA. A partire dalla terza settimana è stata effettuata una conta sia in ALOA che in PCA dopo aver osservato un calo notevole nelle conte, in modo tale da verificare se questo calo fosse dovuto all'effettiva morte delle cellule o alla difficoltà delle cellule stressate di crescere su un terreno selettivo. Dalla quarta settimana in poi è stato utilizzato solo PCA.

Nelle tabelle riportate in seguito si possono osservare tutti i risultati ottenuti nel corso delle 12 settimane di esperimento (lo sfondo in bianco corrisponde alle conte in ALOA; lo sfondo in grigio chiaro indica i dati relativi alle conte su PCA).

| <i>Lm19111 – 30°C</i> | | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| Coltura 1 | | | | | | | | | | |
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | – | – | 87 | 18 | – | 9.55 x 10 ⁶ | 7.0 |
| | 2 | – | – | – | – | 0 | 0 | – | 0 | – |
| | 3 | – | – | – | – | 31 | 1 | – | 2.91 x 10 ⁶ | 6.5 |
| S2 | 1 | – | – | – | – | 10 | 2 | – | 1.09 x 10 ⁶ | 6.0 |
| | 2 | – | – | – | 4 | 0 | – | – | 3.64 x 10 ⁴ | 4.6 |
| S3 (ALOA) | | – | – | 0 | 0 | – | – | – | 0 | – |
| S3 (PCA) | | – | – | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| S4 | 1 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 1 (PCA) | – | – | – | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 2 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 2 (PCA) | 273 | 26 | 3 | – | – | – | – | 2.64 x 10 ² | 2.4 |
| S5 | | – | >400 | 372 | – | – | – | – | 0 | – |
| S6 | | – | – | 285 | 50 | – | – | – | 3.72 x 10 ⁴ | 4.6 |
| S7 | | – | – | 133 | 16 | – | – | – | 3.05 x 10 ⁴ | 4.5 |
| S8 | | – | – | 0 | 0 | – | – | – | 1.35 x 10 ⁴ | 4.1 |
| S9 | | >2000 | 1880 | – | – | – | – | – | 0 | – |
| S10 | | – | – | 408 | 113 | – | – | – | 1.71 x 10 ⁴ | 4.2 |
| S11 | | – | – | 42 | 8 | 2 | – | – | 4.74 x 10 ⁴ | 4.7 |
| S12 | | – | >1000 | 806 | 97 | – | – | – | 4.55 x 10 ³ | 3.7 |

| Coltura 2 | | | | | | | | | | |
|------------------|----------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | – | – | 62 | 15 | – | 7.00 x 10 ⁶ | 6.8 |
| | 2 | – | – | – | – | 36 | 8 | – | 4.00 x 10 ⁶ | 6.6 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------|----------|----|---|---|---|----|---|---|--------------------|-----|
| | 3 | - | - | - | - | 55 | 4 | - | 5.36×10^6 | 6.7 |
| S2 | 1 | - | - | - | - | 4 | 0 | - | 3.64×10^5 | 5.6 |
| | 2 | - | - | - | 8 | 0 | - | - | 7.27×10^4 | 4.9 |
| S3 (ALOA) | | - | - | 4 | 0 | - | - | - | 3.64×10^3 | 3.6 |
| S3 (PCA) | | - | - | - | - | - | 1 | 0 | 9.09×10^4 | 5.0 |
| S4 | 1 (ALOA) | 56 | - | - | - | - | - | - | 560 | 2.7 |
| | 1 (PCA) | - | - | - | 0 | 0 | - | - | 0 | - |

| Coltura 3 | | | | | | | | | | |
|-----------|----------|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|--------------------|-----|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | - | - | - | - | 69 | 12 | - | 7.36×10^6 | 6.9 |
| | 2 | - | - | - | - | 34 | 2 | - | 3.27×10^6 | 6.5 |
| | 3 | - | - | - | - | 40 | 4 | - | 4.00×10^6 | 6.6 |
| S2 | 1 | - | - | - | - | 6 | 2 | - | 7.27×10^5 | 5.9 |
| | 2 | - | - | - | 2 | 0 | - | - | 1.82×10^4 | 4.3 |
| S3 (ALOA) | | - | - | 0 | 0 | - | - | - | 0 | - |
| S3 (PCA) | | - | - | - | - | - | 0 | 0 | 0 | - |
| S4 | 1 (ALOA) | 0 | - | - | - | - | - | - | 0 | - |
| | 1 (PCA) | - | - | - | 0 | 0 | - | - | 0 | - |
| | 2 (ALOA) | 0 | - | - | - | - | - | - | 0 | - |
| | 2 (PCA) | 0 | 0 | 0 | - | - | - | - | 0 | - |

| Coltura 4 | | | | | | | | | | |
|-----------|---|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|--------------------|-----|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | - | - | - | - | 71 | 14 | - | 7.73×10^6 | 6.9 |
| | 2 | - | - | - | - | 28 | 4 | - | 2.91×10^6 | 6.5 |
| | 3 | - | - | - | - | 47 | 6 | - | 4.82×10^6 | 6.7 |
| S2 | 1 | - | - | - | - | 5 | 0 | - | 4.55×10^5 | 5.7 |
| | 2 | - | - | - | 2 | 1 | - | - | 2.73×10^4 | 4.4 |
| S3 (ALOA) | | - | - | 2 | 0 | - | - | - | 1.82×10^3 | 3.3 |

| | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S3 (PCA) | | – | – | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| S4 | 1 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 1 (PCA) | – | – | – | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 2 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 2 (PCA) | 0 | 0 | 0 | – | – | – | – | 0 | – |

| | | Coltura 5 | | | | | | | | |
|------------------|-----------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| | | Diluizioni (numero colonie) | | | | | | | N (cell/ml) | log |
| | | MADRE | -1 | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | | |
| S1 | 1 | – | – | – | – | 111 | 14 | – | 1.14 x 10 ⁷ | 7.1 |
| | 2 | – | – | – | – | 30 | 1 | – | 2.82 x 10 ⁶ | 6.4 |
| | 3 | – | – | – | – | 40 | 4 | – | 4.00 x 10 ⁶ | 6.6 |
| S2 | 1 | – | – | – | – | 3 | 0 | – | 2.73 x 10 ⁵ | 5.4 |
| | 2 | – | – | – | 2 | 0 | – | – | 1.82 x 10 ⁴ | 4.3 |
| S3 (ALOA) | | – | – | 1 | 0 | – | – | – | 9.09 x 10 ² | 3.0 |
| S3 (PCA) | | – | – | – | – | – | 0 | 0 | 0 | – |
| S4 | 1 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 1 (PCA) | – | – | – | 0 | 0 | – | – | 0 | – |
| | 2 (ALOA) | 0 | – | – | – | – | – | – | 0 | – |
| | 2 (PCA) | 0 | 0 | 0 | – | – | – | – | 0 | – |

Tabella 11.3. Risultati ottenuti in seguito alla conta su piastra in ALOA e PCA per le cinque colture di Lm19111 poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento

Dalle tabelle appena riportate, è possibile notare che anche per il ceppo *Lm19111*, delle cinque colture poste a 30°C solo una mostra crescita su piastra per tutte e 12 le settimane di esperimento. La coltura numero 1, infatti, ha continuato a mostrare crescita su PCA fino all'ultimo monitoraggio della dodicesima settimana. Al contrario per le colture numero 2, 3, 4 e 5 il monitoraggio attraverso la conta su piastra è stato interrotto precocemente. In particolare, il monitoraggio della coltura numero 2 è stato interrotto in corrispondenza della quarta settimana a causa di un'evidente contaminazione della coltura da parte di muffe. Per

le colture numero 3, 4 e 5, invece, il monitoraggio è stato interrotto alla fine della quarta settimana a causa di un azzeramento delle conte sia su ALOA che su PCA.

Si riporta ora il grafico riassuntivo dei dati presentati in *Tabella 11.3*, che consente di visualizzare l'andamento delle colture di *Lm19111* all'interno delle cinque Falcon poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento. Come visto anche per i grafici precedenti, sull'asse delle ascisse si riportano i giorni in cui sono state eseguite le conte su piastra, mentre sull'asse delle ordinate si riporta il valore log (logaritmo in base 10 di N). Per i punti temporali in cui è stata eseguita in contemporanea sia la conta in ALOA che la conta in PCA, si è deciso di tener conto all'interno del grafico unicamente del valore di log ottenuto attraverso la conta su piastra in ALOA (le conte su PCA erano pari a zero, probabilmente perché sono state scelte delle diluizioni troppo alte).

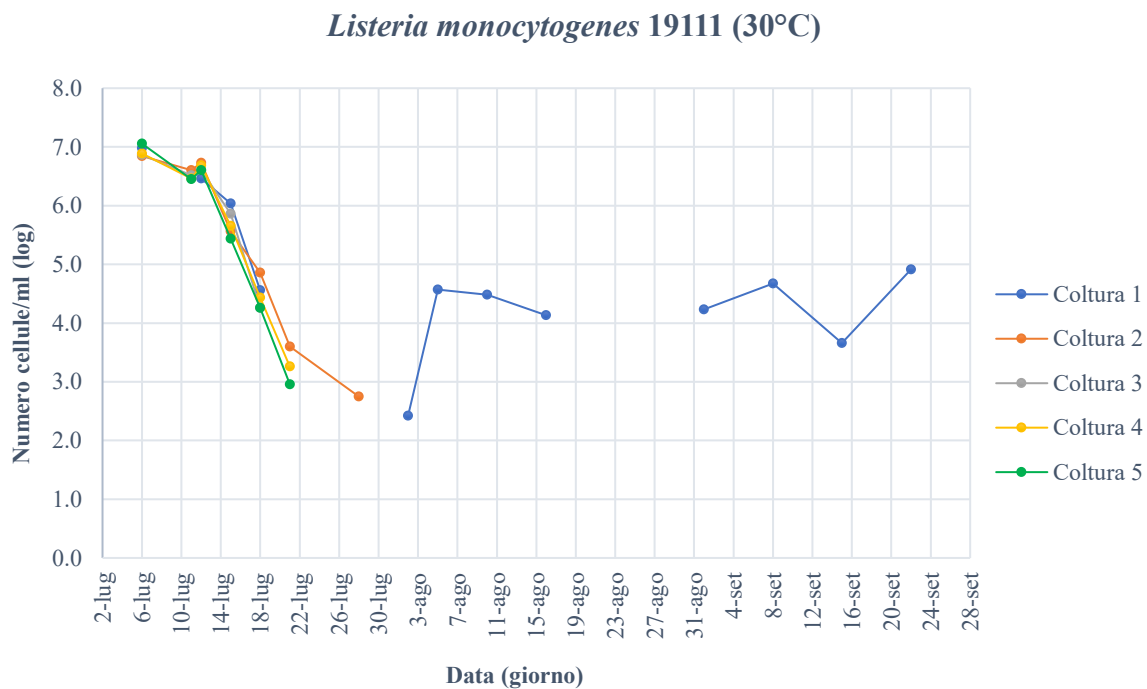


Grafico 8. Andamento delle cinque colture di *Lm19111* poste a 30°C nel corso delle 12 settimane di esperimento (conta su piastra in ALOA e poi in PCA a partire dal 2 agosto 2022)

La linea relativa all'andamento della coltura numero 1 all'interno del grafico appare frammentata. Nei punti in cui non è riportato alcun dato sono state ottenute delle conte (in ALOA o PCA) pari a zero.

Per concludere, analogamente a quanto fatto anche per il ceppo precedente, è stato costruito un ulteriore grafico, che riassume tutte le informazioni raccolte per il ceppo *Lm19111* attraverso la conta su piastra. Anche in questo caso è stata calcolata la media tra i valori log ottenuti per le cinque colture poste a 4°C e per le cinque colture poste a 30°C e i dati ottenuti sono stati utilizzati per la costruzione del grafico in questione. La linea in rosa rappresenta l'andamento medio delle colture poste a 30°C nel corso dell'esperimento, mentre la linea in azzurro rappresenta l'andamento medio delle colture poste a 4°C. Come fatto anche per il ceppo precedente, al valore di log medio per ogni punto temporale è stato associato un errore, corrispondente alla deviazione standard rispetto alla media. In seguito al grafico, è riportata una tabella che contiene tutti i dati che sono stati utili alla costruzione del grafico.

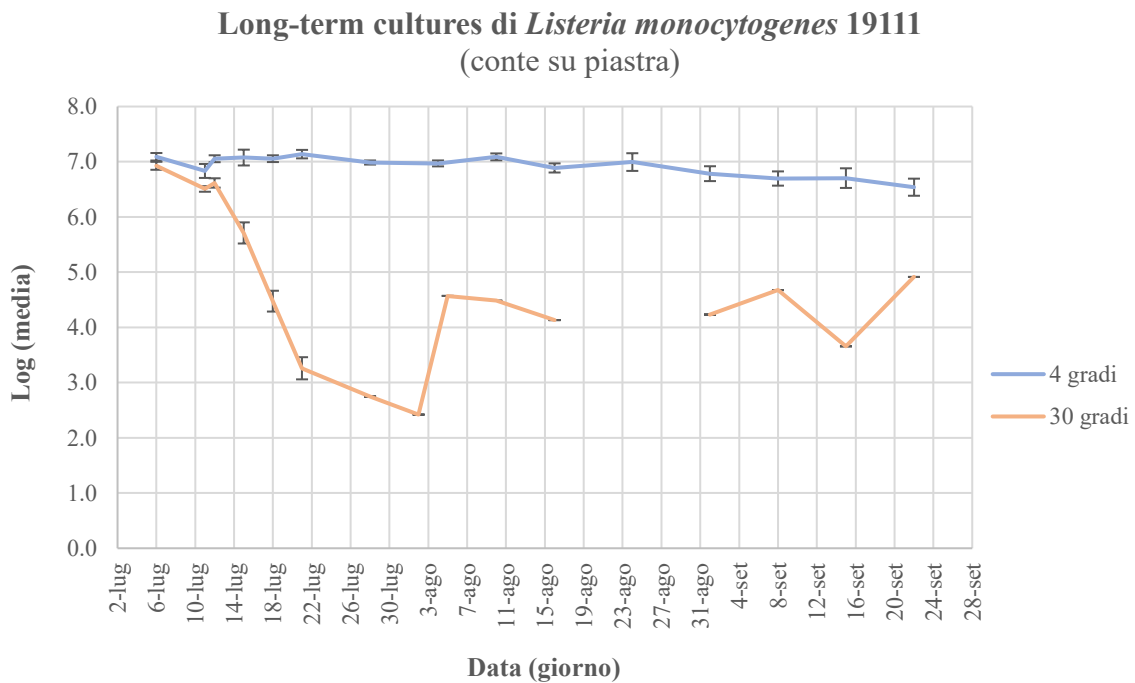


Grafico 9. Andamento complessivo delle cinque colture di *Lm19111* poste a 30°C (in rosa) e delle cinque colture di *Lm19111* poste a 4°C (in azzurro) nel corso delle 12 settimane di esperimento

| | | <i>Lm19111</i> | | | |
|-----|---|----------------|---------------|-------------|---------------|
| | | 4 gradi | | 30 gradi | |
| | | Log (media) | Dev. standard | Log (media) | Dev. standard |
| S1 | 1 | 7.1 | 0.068 | 6.9 | 0.072 |
| | 2 | 6.8 | 0.126 | 6.5 | 0.051 |
| | 3 | 7.1 | 0.063 | 6.6 | 0.085 |
| S2 | 1 | 7.1 | 0.143 | 5.7 | 0.191 |
| | 2 | 7.1 | 0.061 | 4.5 | 0.189 |
| S3 | | 7.1 | 0.077 | 3.3 | 0.201 |
| S4 | 1 | 7.0 | 0.037 | 2.7 | 0 |
| | 2 | – | – | 2.4 | 0 |
| S5 | | 7.0 | 0.054 | 4.6 | 0 |
| S6 | | 7.1 | 0.062 | 4.5 | 0 |
| S7 | | 6.9 | 0.083 | 4.1 | 0 |
| S8 | | 7.0 | 0.160 | – | – |
| S9 | | 6.8 | 0.134 | 4.2 | 0 |
| S10 | | 6.7 | 0.129 | 4.7 | 0 |
| S11 | | 6.7 | 0.178 | 3.7 | 0 |
| S12 | | 6.5 | 0.155 | 4.9 | 0 |

Tabella 12. Tabella riassuntiva dei dati ottenuti dal monitoraggio di *Lm19111* a 4°C (a sinistra) e a 30°C (a destra) attraverso conta su piastra

6. Monitoraggio delle *long-term cultures* – PCR real-time

Oltre alla conta su piastra (in ALOA o PCA) che ha avuto un ruolo importante nel monitoraggio delle *long-term cultures*, l'andamento delle colture in esame è stato studiato anche ricorrendo alla PCR real-time. In particolare, nell'arco delle 12 settimane di esperimento sono stati scelti tre punti temporali in corrispondenza dell'inizio, della metà e della fine dell'esperimento. Nel dettaglio le date scelte sono state 6 luglio (prima settimana), 28 luglio (quarta settimana) e 8 settembre (decima settimana). In corrispondenza di queste date è stata eseguita l'estrazione del DNA a partire da ciascuna coltura, seguita dalla reazione di PCR real-time in doppio per ciascun campione. In particolare, la PCR real-time è stata eseguita solamente per le colture dei ceppi *Lm113* e *Lm19111* (sia per quelle incubate a 4°C, che per quelle incubate a 30°C). Il ceppo *Lm246*, invece, non è stato preso in considerazione a causa delle problematiche di contaminazione emerse durante la conta su piastra in ALOA.

***Listeria monocytogenes* 113**

Vengono riportati in seguito i valori di Ct (threshold cycle) ottenuti per le cinque colture di *Lm113* poste a 4°C e per le cinque poste a 30°C in corrispondenza dei tre punti temporali scelti. La PCR real-time è stata eseguita solamente su campioni per cui si osservava ancora crescita su piastra (ALOA o PCA). Ogni campione è stato esaminato in doppio, quindi per ogni coltura sono disponibili due valori di Ct, che sono stati poi utilizzati per calcolare una media (Ct_{medio}) per ciascun campione.

| <i>Lm113</i> – 4°C | | | | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | 6 luglio | | | 28 luglio | | | 8 settembre | | |
| | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} |
| Coltura1 | 28.99 | 28.86 | 28.93 | 25.22 | 26.22 | 25.72 | 27.18 | 27.22 | 27.20 |
| Coltura2 | 28.73 | 28.67 | 28.70 | 26.30 | 26.26 | 26.28 | 27.72 | 28.30 | 28.01 |
| Coltura3 | 28.46 | 28.63 | 28.55 | 25.77 | 26.07 | 25.92 | 28.08 | 27.80 | 27.94 |
| Coltura4 | 29.51 | 29.07 | 29.29 | 26.20 | 25.82 | 26.01 | 27.20 | 27.69 | 27.45 |
| Coltura5 | 29.65 | 29.49 | 29.57 | 26.16 | 26.31 | 26.24 | 27.79 | 27.89 | 27.84 |

| <i>Lm113</i> – 30°C | | | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | 6 luglio | | | 28 luglio | | | 8 settembre | | |
| | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} |
| Coltura1 | 29.81 | 29.59 | 29.70 | 28.25 | 28.31 | 28.28 | – | – | – |
| Coltura2 | 29.50 | 29.91 | 29.71 | 28.05 | 28.02 | 28.04 | – | – | – |
| Coltura3 | 29.43 | 29.46 | 29.45 | 28.06 | 28.01 | 28.04 | 28.33 | – | 28.33 |
| Coltura4 | 29.24 | 29.56 | 29.40 | 28.31 | 28.19 | 28.25 | – | – | – |
| Coltura5 | 29.25 | 28.13 | 28.69 | 28.66 | 28.82 | 28.74 | – | – | – |

Tabella 13.1 Cicli threshold ottenuti per ciascuna coltura di Lm113 (a 4°C e a 30°C) con PCR real-time

A questo punto, è stato calcolato il valore di Ct complessivo (Ct_{finale}) per ogni punto temporale alle due temperature, facendo una media tra i cinque Ct_{medio} delle cinque colture. A ciascun valore di Ct_{finale} ottenuto è stato associato anche un errore, dato dalla deviazione standard rispetto alla media per ogni punto temporale. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente.

| | <i>Lm113</i> – 4°C | | <i>Lm113</i> – 30°C | |
|--------------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| | Ct _{finale} | Dev. standard | Ct _{finale} | Dev. standard |
| 6 luglio | 29.01 | 0.34 | 29.39 | 0.28 |
| 28 luglio | 26.03 | 0.18 | 28.27 | 0.19 |
| 8 settembre | 27.69 | 0.29 | 28.33 | 0 |

Tabella 13.2 Cicli threshold complessivi (Ct_{finale}) per ogni punto temporale con deviazione standard associata

I dati rappresentati in Tabella 13.2 sono stati riportati all'interno di un grafico in modo tale da essere più facilmente confrontati tra loro. Sull'asse delle ascisse è stato riportato il tempo (quindi i giorni in cui è stata effettuata la PCR real-time), mentre sull'asse delle ordinate sono stati posti i valori di Ct_{finale} (con i valori di deviazione standard associati).

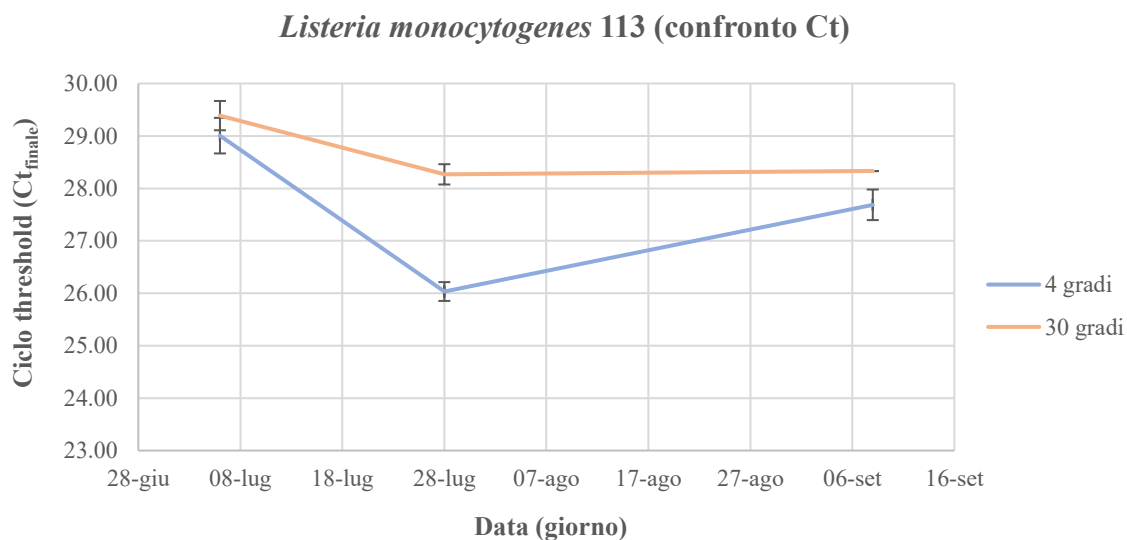


Grafico 10. Confronto tra i Ct_{finale} di *Lm113* a 4°C (in azzurro) e a 30°C (in rosa) in corrispondenza dei tre punti temporali

In generale, un abbassamento del valore medio di Ct da un punto temporale all'altro sta ad indicare un aumento in numero del materiale genetico riconducibile a *L. monocytogenes* all'interno delle colture. Al contrario un aumento di questo valore sta ad indicare una diminuzione del materiale genetico riconducibile a *L. monocytogenes* all'interno delle colture in esame.

***Listeria monocytogenes* 19111**

Anche per *Lm*19111 vengono riportati i valori di Ct (threshold cycle) ottenuti per le dieci colture in corrispondenza dei tre punti temporali stabiliti. Come per il ceppo precedente, anche in questo caso la PCR real-time è stata eseguita solamente su campioni per cui si osservava ancora crescita su piastra (ALOA o PCA) ed è stata eseguita in doppio.

Vengono riportati in seguito i risultati ottenuti.

| <i>Lm</i>19111 – 4°C | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | 6 luglio | | | 28 luglio | | | 8 settembre | | |
| | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} |
| Coltura1 | 28.00 | 27.93 | 27.97 | 25.83 | 25.80 | 25.82 | 25.14 | 25.52 | 25.33 |
| Coltura2 | 27.84 | 28.13 | 27.99 | 26.03 | 25.98 | 26.01 | 25.69 | 26.04 | 25.87 |
| Coltura3 | 28.17 | 28.48 | 28.33 | 25.82 | 25.85 | 25.84 | 24.92 | 25.13 | 25.03 |
| Coltura4 | 28.76 | 28.77 | 28.77 | 26.87 | 26.77 | 26.82 | 25.81 | 25.91 | 25.86 |
| Coltura5 | 28.84 | 28.67 | 28.76 | 27.04 | 26.88 | 26.96 | 25.76 | 25.85 | 25.81 |

| <i>Lm</i>19111 – 30°C | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | 6 luglio | | | 28 luglio | | | 8 settembre | | |
| | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} |
| Coltura1 | 28.92 | 28.80 | 28.86 | 24.75 | 24.70 | 24.73 | 24.47 | 23.09 | 23.78 |
| Coltura2 | 28.82 | 28.90 | 28.86 | 24.81 | 25.64 | 25.23 | – | – | – |
| Coltura3 | 27.53 | 28.57 | 28.05 | 25.51 | 25.60 | 25.56 | – | – | – |
| Coltura4 | 29.49 | 29.72 | 29.61 | 25.30 | 25.26 | 25.28 | – | – | – |
| Coltura5 | 28.04 | 28.64 | 28.34 | 25.74 | 25.46 | 25.60 | – | – | – |

Tabella 14.1 Cicli threshold ottenuti per ciascuna coltura di Lm19111 (a 4°C e a 30°C) con PCR real-time

Dopo aver ottenuto i valori di Ct_{medio} per ciascuna coltura alle due temperature, è stato calcolato il valore di Ct_{finale} analogamente a quanto visto per il ceppo precedente. Anche in questo caso, a ciascun valore di Ct_{finale} ottenuto è stato associato un errore, dato dalla deviazione standard rispetto alla media per ogni punto temporale.

| | <i>Lm19111</i> – 4°C | | <i>Lm19111</i> – 30°C | |
|--------------------|----------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| | Ct _{finale} | Dev. standard | Ct _{finale} | Dev. standard |
| 6 luglio | 28.36 | 0.32 | 28.74 | 0.44 |
| 28 luglio | 26.29 | 0.48 | 25.28 | 0.24 |
| 8 settembre | 25.58 | 0.32 | 23.78 | 0 |

Tabella 14.2 Cicli threshold complessivi (Ct_{finale}) per ogni punto temporale con deviazione standard associata

Infine, si riporta un grafico che consente di visualizzare più facilmente i dati riportati all'interno di Tabella 14.2. Sull'asse delle ascisse viene riportato il tempo e sull'asse delle ordinate i valori di Ct_{finale} (con deviazione standard associata).

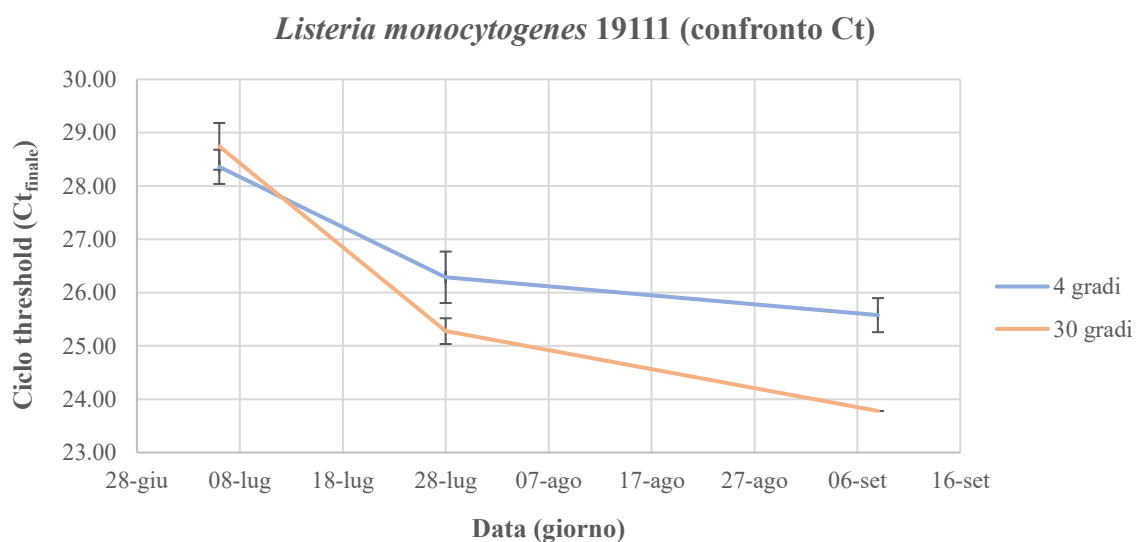


Grafico 11. Confronto tra i Ct_{finale} di *Lm19111* a 4°C (in azzurro) e a 30°C (in rosa) in corrispondenza dei tre punti temporali

6.1 Costruzione delle curve standard

Come visto nel paragrafo precedente, la reazione di PCR real-time è stata utilizzata per effettuare un confronto tra le colture di uno stesso ceppo poste alle due diverse temperature (4°C e 30°C) in corrispondenza delle tre date scelte. In aggiunta, si è scelto di sfruttare la PCR real-time anche per la costruzione di curve standard, che permettono di quantificare le cellule di *Listeria monocytogenes* presenti in ciascuna coltura in corrispondenza delle tre date in esame. Per fare ciò, sono state utilizzate le aliquote prelevate al momento del raggiungimento della fase pre-stazionaria, che presentavano una concentrazione rispettivamente di 1.45×10^8 cell/ml (nel caso di *Lm113*) e di 2.45×10^8 cell/ml (nel caso di *Lm19111*) (Tabella 6). Anche in questo caso, si è deciso di considerare solamente i ceppi *Lm113* e

Lm19111, mentre la costruzione della curva standard per *Lm246* è stata tralasciata a causa delle possibili contaminazioni delle colture emerse durante la conta su piastra in ALOA.

Come descritto precedentemente in Materiali e metodi, a partire dalle aliquote a concentrazione nota è stata eseguita l'estrazione del DNA e gli estratti ottenuti sono stati diluiti per ottenere delle diluizioni scalari 1:2. A partire da queste diluizioni sono stati utilizzati 2.5 µl per eseguire la reazione di PCR real-time.

Vengono riportati in seguito i risultati ottenuti, divisi per ceppo.

- ***Listeria monocytogenes* 113**

Nella tabella seguente, vengono riportati i dati che sono stati utilizzati per la costruzione della curva standard di *Lm113*. Innanzitutto, si riportano le concentrazioni corrispondenti a ciascuna diluizione ottenuta, insieme al numero di cellule contenute in 2.5 µl di campione. 2.5 µl è stato il volume di estratto aggiunto alla Master Mix per ogni campione per l'esecuzione della PCR real-time. A partire dal numero di cellule in 2.5 µl è stato calcolato il logaritmo in base 10 (logNC). Ogni campione è stato analizzato in doppio, quindi nella tabella sono riportati due valori di Ct (threshold cycle) per diluizione.

| | <i>Lm113</i> | | | | | |
|--------------------|--------------------------|------------------------------------|-------|-----------------|-----------------|---------------------|
| | Concentrazione (cell/ml) | Numero di cellule (NC) (in 2.5 µl) | logNC | Ct ₁ | Ct ₂ | Ct _{medio} |
| MADRE | 1.45 x 10 ⁸ | 3.61 x 10 ⁵ | 5.6 | 21.57 | 21.34 | 21.46 |
| Diluizione1 | 7.23 x 10 ⁷ | 1.81 x 10 ⁵ | 5.3 | 22.03 | 22.08 | 22.06 |
| Diluizione2 | 3.61 x 10 ⁷ | 9.03 x 10 ⁴ | 5.0 | 22.94 | 22.86 | 22.90 |
| Diluizione3 | 1.81 x 10 ⁷ | 4.52 x 10 ⁴ | 4.7 | 23.72 | 23.77 | 23.75 |
| Diluizione4 | 9.03 x 10 ⁶ | 2.26 x 10 ⁴ | 4.4 | 24.75 | 24.72 | 24.74 |
| Diluizione5 | 4.52 x 10 ⁶ | 1.13 x 10 ⁴ | 4.1 | 25.65 | 25.51 | 25.58 |
| Diluizione6 | 2.26 x 10 ⁶ | 5.65 x 10 ³ | 3.8 | 26.71 | 26.64 | 26.68 |
| Diluizione7 | 1.13 x 10 ⁶ | 2.82 x 10 ³ | 3.5 | 27.58 | 27.67 | 27.63 |

Tabella 15.1 Dati raccolti necessari alla costruzione di una curva standard per *Lm113*

Dopo aver calcolato il valore di Ct_{medio} per ogni diluizione, questo valore è stato utilizzato per la costruzione del grafico che rappresenta la curva standard. I valori di Ct_{medio}, infatti, sono stati posti sull'asse delle ordinate, mentre sull'asse delle ascisse sono stati posti i valori di logNC.

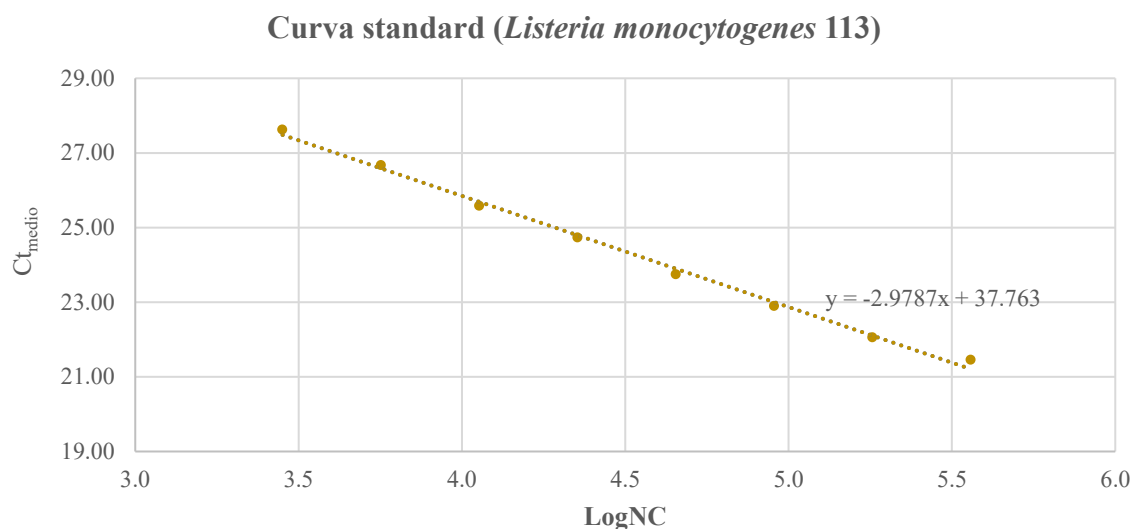


Grafico 12. Curva standard per Listeria monocytogenes 113

Dopo aver posizionato i punti all'interno del grafico, è stata ricavata una linea di tendenza lineare in base all'andamento di questi punti, con la sua equazione (visibile nel grafico). Basandosi sull'equazione di questa retta, per interpolazione sono stati ricavati i valori di logNC per i tre Ct_{finali} di *Lm113* riportati nel paragrafo precedente (6), sia per le colture incubate a 4°C che quelle incubate a 30°C. Dai valori di logNC ottenuti per i tre Ct_{finali}, è stato calcolato il valore corrispettivo di N (numero di cellule per ml), da cui a sua volta è stato calcolato il logaritmo in base 10 (log). Il valore di log ottenuto per ciascuna delle due temperature in esame, quindi, è stato confrontato con il valore log (medio) che era stato calcolato in precedenza attraverso le conte su piastra (in ALOA o PCA) (log_{conte}).

Si riportano in seguito due tabelle contenenti tutti i dati in questione.

| <i>Lm113 – 4°C</i> | | | | | |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------|----------------------------|
| | Ct_{finale} | logNC (per interpolazione) | N (cell/ml) | log | log_{conte} |
| 6 luglio | 29.01 | 2.94 | 3.47 x 10 ⁵ | 5.5 | 6.9 |
| 28 luglio | 26.03 | 3.94 | 3.48 x 10 ⁶ | 6.5 | 6.9 |
| 8 settembre | 27.69 | 3.38 | 9.63 x 10 ⁵ | 6.0 | 6.4 |

Tabella 15.2 Valori di logNC per ognuno dei tre punti temporali ottenuti per interpolazione e confronto dei valori ottenuti a partire dalla curva standard con i logaritmi ottenuti a partire dalle conte (colture a 4°C)

| <i>Lm113</i> – 30°C | | | | | |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------|----------------------------|
| | Ct_{finale} | logNC (per interpolazione) | N (cell/ml) | log | log_{conte} |
| 6 luglio | 29.39 | 2.81 | 2.59 x 10 ⁵ | 5.4 | 6.8 |
| 28 luglio | 28.27 | 3.19 | 6.15 x 10 ⁵ | 5.8 | 4.9 |
| 8 settembre | 28.33 | 3.17 | 5.87 x 10 ⁵ | 5.8 | 1.8 |

Tabella 15.3 Valori di logNC per ognuno dei tre punti temporali ottenuti per interpolazione e confronto dei valori ottenuti a partire dalla curva standard con i logaritmi ottenuti a partire dalle conte (colture a 30°C)

- ***Listeria monocytogenes* 19111**

Analogamente a quanto visto per il ceppo *Lm113*, anche per *Lm19111* è stata costruita una curva standard, partendo dalle otto diluizioni a concentrazione nota. Nella tabella seguente, si riportano tutti i dati disponibili per *Lm19111* necessari alla costruzione della curva standard. Anche in questo caso, ogni campione è stato analizzato in doppio.

| <i>Lm19111</i> | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|--|--------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|
| | Concentrazione (cell/ml) | Numero di cellule (NC) (in 2.5 µl) | logNC | Ct₁ | Ct₂ | Ct_{medio} |
| MADRE | 2.45 x 10 ⁸ | 6.11 x 10 ⁵ | 5.8 | 21.36 | 21.32 | 21.34 |
| Diluizione1 | 1.22 x 10 ⁸ | 3.06 x 10 ⁵ | 5.5 | 22.22 | 22.17 | 22.20 |
| Diluizione2 | 6.11 x 10 ⁷ | 1.53 x 10 ⁵ | 5.2 | 22.97 | 22.89 | 22.93 |
| Diluizione3 | 3.06 x 10 ⁷ | 7.64 x 10 ⁴ | 4.9 | 23.76 | 23.82 | 23.79 |
| Diluizione4 | 1.53 x 10 ⁷ | 3.82 x 10 ⁴ | 4.6 | 24.72 | 24.67 | 24.70 |
| Diluizione5 | 7.64 x 10 ⁶ | 1.91 x 10 ⁴ | 4.3 | 25.62 | 25.63 | 25.63 |
| Diluizione6 | 3.82 x 10 ⁶ | 9.55 x 10 ³ | 4.0 | 26.70 | 26.64 | 26.67 |
| Diluizione7 | 1.91 x 10 ⁶ | 4.78 x 10 ³ | 3.7 | 27.67 | 27.67 | 27.67 |

Tabella 16.1 Dati raccolti necessari alla costruzione di una curva standard per *Lm19111*

Anche in questo caso, dopo aver calcolato il valore di Ct_{medio} per ogni diluizione, questo è stato utilizzato per la costruzione della curva standard. I valori di Ct_{medio} sono stati posti sull'asse delle ordinate, mentre sull'asse delle ascisse sono stati posti i valori di logNC.

Curva standard (*Listeria monocytogenes* 19111)

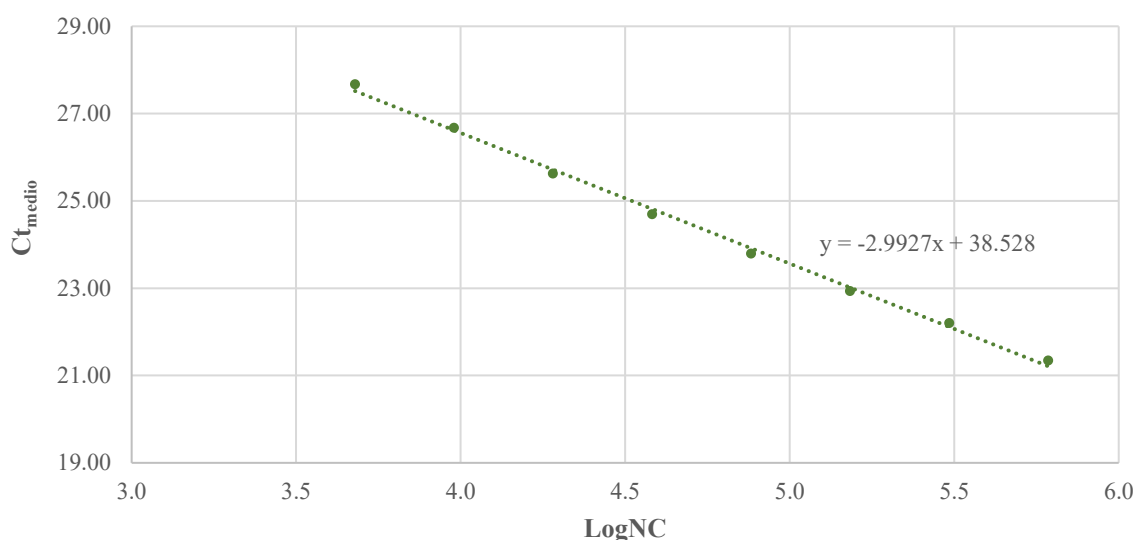


Grafico 13. Curva standard per Listeria monocytogenes 19111

Dopo aver posizionato i punti all'interno del grafico, è stata ricavata una linea di tendenza lineare in base all'andamento di questi punti, con la sua equazione (visibile nel grafico). A partire da questa equazione sono stati ricavati i valori di logNC per interpolazione per i tre Ct_{finali} di *Lm*19111 riportati nel paragrafo precedente (6), sia per le colture incubate a 4°C che per quelle incubate a 30°C. Da questi è stato calcolato il valore corrispettivo di N (numero di cellule per ml) per ciascun punto, da cui è stato successivamente calcolato il logaritmo in base 10 (log). I valori di log ottenuti per ciascuna delle due temperature in esame sono stati confrontati con i valori di log (medi) ottenuti in precedenza attraverso le conte su piastra (in ALOA o PCA) (log_{conte}).

Si riportano nelle due tabelle seguenti i risultati ottenuti.

| <i>Lm</i>19111 – 4°C | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------|----------------------------|
| | Ct_{finale} | logNC (per interpolazione) | N (cell/ml) | log | log_{conte} |
| 6 luglio | 28.36 | 3.40 | 1.00 x 10 ⁶ | 6.0 | 7.1 |
| 28 luglio | 26.29 | 4.09 | 4.91 x 10 ⁶ | 6.7 | 7.0 |
| 8 settembre | 25.58 | 4.33 | 8.48 x 10 ⁶ | 6.9 | 6.7 |

Tabella 16.2 Valori di logNC per ognuno dei tre punti temporali ottenuti per interpolazione e confronto dei valori ottenuti a partire dalla curva standard con i logaritmi ottenuti a partire dalle conte (colture a 4°C)

| <i>Lm19111 – 30°C</i> | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------|----------------------------|
| | Ct_{finale} | logNC (per interpolazione) | N (cell/ml) | log | log_{conte} |
| 6 luglio | 28.74 | 3.27 | 7.46 x 10 ⁵ | 5.9 | 6.9 |
| 28 luglio | 25.28 | 4.43 | 1.07 x 10 ⁷ | 7.0 | 2.7 |
| 8 settembre | 23.78 | 4.93 | 3.39 x 10 ⁷ | 7.5 | 4.7 |

Tabella 16.3 Valori di logNC per ognuno dei tre punti temporali ottenuti per interpolazione e confronto dei valori ottenuti a partire dalla curva standard con i logaritmi ottenuti a partire dalle conte (colture a 30°C)

In generale, il confronto tra i valori log derivanti dalla conta su piastra e i valori log ottenuti per interpolazione dalle curve standard ha mostrato delle anomalie. Queste potrebbero essere dovute alla possibile necrofagia messa in atto dalle cellule stressate o a dei problemi durante la fase di estrazione. Il kit della Bio-Rad utilizzato per l'estrazione del DNA di *L. monocytogenes*, infatti, è stato messo a punto per la rilevazione del patogeno e non tanto per la sua quantificazione. Quindi, è possibile che l'efficienza di estrazione che si ottiene utilizzando questo kit sia ridotta e questo influisce sulla successiva quantificazione mediante curva standard.

7. Monitoraggio delle *long-term cultures* – test del biofilm

Il test del biofilm, come riportato precedentemente all'interno della *Tabella 7*, è stato effettuato a inizio, a metà e a fine esperimento, precisamente nei giorni 8 luglio (prima settimana), 2 settembre (nona settimana) e 26 settembre (dodicesima settimana). Questo test aveva lo scopo di approfondire le conoscenze riguardo la capacità di formare biofilm delle cellule che costituiscono le *long-term cultures* in esame. Vengono riportati in seguito i risultati ottenuti divisi per ceppo e per temperatura di incubazione (4°C e 30°C).

***Listeria monocytogenes* 246**

Si riportano i dati grezzi derivanti dalla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di *Lm246* poste a 4°C. Questi dati fanno riferimento alla prima misurazione effettuata, in corrispondenza del giorno 8 luglio.

| Lm246 – 4°C (inizio esperimento – 8 luglio) | | | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Replica 6 |
| Coltura 1 | 0.7477 | 0.6138 | 0.5829 | 0.5846 | 0.5906 | 0.5713 |
| Coltura 2 | 0.6242 | 0.5779 | 0.5418 | 0.5180 | 0.7063 | 0.6166 |
| Coltura 3 | 0.6585 | 0.5819 | 0.5841 | 0.4922 | 0.7137 | 0.6224 |
| Coltura 4 | 0.6024 | 0.7160 | 0.5822 | 0.7133 | 0.6822 | 0.6179 |
| Coltura 5 | 0.5351 | 0.6878 | 0.5728 | 0.4992 | 0.6308 | 0.5422 |
| Bianco | 0.0529 | 0.0604 | 0.0582 | 0.0593 | 0.0559 | 0.0662 |

Tabella 17.1. Dati grezzi ottenuti in seguito alla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di Lm246 incubate a 4°C (inizio esperimento)

I dati grezzi riportati nella tabella precedente sono stati rielaborati in modo tale da ottenere i dati effettivi finali. Per cominciare, è stato calcolato il valore complessivo del bianco, facendo una media tra i sei valori di bianco ottenuti dalle sei repliche.

$$Bianco_{media} = \frac{Bianco_1 + Bianco_2 + Bianco_3 + Bianco_4 + Bianco_5 + Bianco_6}{6} = 0.0588$$

A questo punto, il valore di bianco ottenuto è stato sottratto a tutti i sei valori di assorbanza ottenuti per ognuna delle cinque colture. Quindi, è stata fatta una media tra i valori di assorbanza normalizzati in questo modo per ognuna delle cinque colture, in modo tale da ottenere un unico valore di assorbanza per ciascuna coltura. A ciascun valore di assorbanza media per ogni coltura è stato associato un errore, dato dal calcolo della deviazione standard rispetto alla media. Si riporta in seguito una tabella con i risultati ottenuti.

| Lm246 – 4°C (inizio esperimento) | | |
|---|--|----------------------|
| | Assorbanza_(media) (OD₅₇₀) | Dev. standard |
| Coltura 1 | 0.5563 | 0.0442 |
| Coltura 2 | 0.5387 | 0.0516 |
| Coltura 3 | 0.5500 | 0.0561 |
| Coltura 4 | 0.5935 | 0.0515 |
| Coltura 5 | 0.5192 | 0.0542 |

Tabella 17.2. Valori di assorbanza complessivi ottenuti dal test del biofilm per ciascuna coltura di Lm246 a 4°C (inizio esperimento)

Lo stesso procedimento è stato seguito anche per la rielaborazione dei dati ottenuti dalla lettura allo spettrofotometro per le colture di *Lm246* poste a 30°C. Si riporta in seguito una tabella contenente i dati grezzi ottenuti, relativi alla prima misurazione effettuata in corrispondenza del giorno 8 luglio.

| <i>Lm246</i> – 30°C (inizio esperimento – 8 luglio) | | | | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Replica 6 |
| Coltura 1 | 1.2851 | 1.3762 | 1.3839 | 1.2247 | 0.9738 | 1.4883 |
| Coltura 2 | 1.6370 | 1.2806 | 1.3636 | 1.4265 | 1.3362 | 1.3679 |
| Coltura 3 | 1.2159 | 1.2720 | 1.3321 | 1.3898 | 1.2782 | 1.1658 |
| Coltura 4 | 1.3303 | 1.2936 | 1.3507 | 1.3387 | 1.3611 | 1.1644 |
| Coltura 5 | 1.2032 | 1.2592 | 1.3665 | 1.4177 | 1.2595 | 1.1714 |
| Bianco | 0.0571 | 0.0601 | 0.0600 | 0.0636 | 0.0480 | 0.0613 |

*Tabella 17.3. Dati grezzi ottenuti in seguito alla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di *Lm246* incubate a 30°C (inizio esperimento)*

Analogamente a quanto visto in precedenza per le colture poste a 4°C, è stata fatta una media tra le sei repliche di bianco ottenute ($\text{bianco}_{\text{media}} = 0.05835$). Il valore complessivo del bianco è stato sottratto a ciascuna lettura ottenuta allo spettrofotometro e successivamente è stata fatta una media tra i sei valori disponibili per ciascuna coltura. A ciascun valore di assorbanza media per ogni coltura è stato associato un errore, dato dal calcolo della deviazione standard rispetto alla media. Si riportano in seguito i risultati ottenuti.

| <i>Lm246</i> – 30°C (inizio esperimento) | | |
|---|--|----------------------|
| | Assorbanza_(media) (OD₅₇₀) | Dev. standard |
| Coltura 1 | 1.2303 | 0.1275 |
| Coltura 2 | 1.3436 | 0.0865 |
| Coltura 3 | 1.2173 | 0.0577 |
| Coltura 4 | 1.2481 | 0.0516 |
| Coltura 5 | 1.2212 | 0.0750 |

*Tabella 17.4. Valori di assorbanza complessivi ottenuti dal test del biofilm per ciascuna coltura di *Lm246* a 30°C (inizio esperimento)*

Per quanto riguarda il ceppo *Lm246*, non sono stati eseguiti ulteriori test del biofilm in corrispondenza delle altre due date scelte. Infatti, eseguire altri due test su questo ceppo non è

stato ritenuto utile a causa della presenza di possibili contaminazioni che sono state osservate già durante la prima settimana di esperimento con le conte su piastra in ALOA.

Inoltre, per questo ceppo, non sono disponibili i dati relativi alle conte su piastra in PCA per la stima del numero di cellule planctoniche presenti. Le diluizioni da piastrire scelte, infatti, sono risultate troppo concentrate, quindi il numero di colonie cresciute su PCA era molto maggiore di 300 e impossibile da contare.

***Listeria monocytogenes* 113**

Per le colture di *Lm113* poste a 4°C vengono riportati tutti i dati ottenuti dai tre test del biofilm effettuati nelle tre date scelte (ad inizio, metà e fine esperimento). Nella tabella seguente si riportano tutti i dati grezzi per ciascuna coltura derivanti dalla lettura allo spettrofotometro, divisi per i tre punti temporali in cui è stato effettuato il test.

| | | <i>Lm113</i> – 4°C | | | | | |
|-------------------------|------------------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Replica 6 |
| Inizio (8/07) | Coltura 1 | 0.1213 | 0.1392 | 0.1928 | 0.1747 | 0.2101 | 0.1480 |
| | Coltura 2 | 0.1286 | 0.1417 | 0.1938 | 0.1622 | 0.1899 | 0.8030 |
| | Coltura 3 | 0.1354 | 0.1855 | 0.1443 | 0.1552 | 0.1716 | 0.1362 |
| | Coltura 4 | 0.1558 | 0.1814 | 0.1615 | 0.1795 | 0.1579 | 0.1648 |
| | Coltura 5 | 0.1776 | 0.1372 | 0.1634 | 0.1971 | 0.1455 | 0.1618 |
| | Bianco | 0.0529 | 0.0604 | 0.0582 | 0.0593 | 0.0559 | 0.0662 |
| Metà (2/09) | Coltura 1 | 0.0580 | 0.0615 | 0.0703 | 0.0731 | 0.0590 | 0.0631 |
| | Coltura 2 | 0.0579 | 0.0578 | 0.0667 | 0.0612 | 0.0602 | 0.0605 |
| | Coltura 3 | 0.0624 | 0.0620 | 0.0599 | 0.0664 | 0.0759 | 0.0649 |
| | Coltura 4 | 0.0532 | 0.0617 | 0.0558 | 0.0725 | 0.0600 | 0.0570 |
| | Coltura 5 | 0.0521 | 0.0526 | 0.0567 | 0.0559 | 0.0593 | 0.0584 |
| | Bianco | 0.0588 | 0.0629 | 0.0753 | 0.0599 | 0.0584 | 0.0656 |
| Fine (26/09) | Coltura 1 | 0.1826 | 0.1754 | 0.3565 | 0.2036 | 0.1556 | 0.3881 |
| | Coltura 2 | 0.2700 | 0.1002 | 0.1739 | 0.1027 | 0.0936 | 0.5861 |
| | Coltura 3 | 0.1838 | 0.2113 | 0.1753 | 0.1676 | 0.1695 | 0.1368 |
| | Coltura 4 | 0.3844 | 0.1306 | 0.2045 | 0.2102 | 0.1653 | 0.1156 |
| | Coltura 5 | 0.1706 | 0.1165 | 0.0972 | 0.1083 | 0.1096 | 0.1256 |
| | Bianco | 0.1500 | 0.1470 | 0.1034 | 0.1175 | 0.1172 | 0.1197 |

Tabella 18.1. Dati grezzi ottenuti in seguito alla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di *Lm113* incubate a 4°C (a inizio, metà e fine esperimento)

Successivamente, è stato calcolato il valore di $\text{bianco}_{\text{media}}$ per ciascuno dei tre punti temporali, facendo la media tra i sei valori di bianco ottenuti. Il valore di $\text{bianco}_{\text{media}}$ ottenuto è stato quindi sottratto ai valori grezzi di assorbanza e, per ogni coltura, è stato ricavato un unico valore di assorbanza (assorbanza media), facendo la media tra i valori di assorbanza normalizzati. Ad ogni valore di assorbanza medio viene associato un errore, dato della deviazione standard rispetto alla media. Nella tabella seguente sono riportati i valori di assorbanza media, di deviazione standard e il valore di bianco medio (con relativa deviazione standard) per i tre punti temporali in cui è stato eseguito il test del biofilm.

| | Inizio (8 luglio) | | Metà (2 settembre) | | Fine (26 settembre) | |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------|
| | Assorbanza media (OD ₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD ₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD ₅₇₀) | Dev. standard |
| Coltura 1 | 0.1055 | 0.0282 | 0.0007 | 0.0050 | 0.1178 | 0.0858 |
| Coltura 2 | 0.2111 | 0.1777 | -0.0028 | 0.0022 | 0.0953 | 0.1380 |
| Coltura 3 | 0.0959 | 0.0161 | 0.0018 | 0.0039 | 0.0483 | 0.0161 |
| Coltura 4 | 0.1080 | 0.0091 | -0.0035 | 0.0047 | 0.0760 | 0.0646 |
| Coltura 5 | 0.1050 | 0.0157 | -0.0077 | 0.0023 | -0.0045 | 0.0179 |
| Bianco_{media} | 0.0588 | 0.0032 | 0.0635 | 0.0046 | 0.1258 | 0.0858 |

Tabella 18.2. Valori di assorbanza complessivi ottenuti dal test del biofilm per ciascuna coltura di *Lm113* a 4°C (a inizio, metà e fine esperimento)

In aggiunta, per i due test del biofilm eseguiti a metà e a fine esperimento, sono disponibili anche i dati relativi alle conte su piastra in PCA, con le quali è stato stimato il numero di cellule planctoniche per coltura. Per il primo test del biofilm effettuato ad inizio esperimento, invece, questi dati non sono disponibili, avendo scelto erroneamente di piastrare delle diluizioni troppo concentrate e quindi impossibili da contare. Nella tabella seguente sono riportati i dati ottenuti.

| <i>Lm113</i> (cellule planctoniche) – 4°C | | | | | | | | | |
|--|--------------------------------|-----------|------------------------|------------|--------------------------------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| | 2 settembre | | | | 26 settembre | | | | |
| | Diluizioni (n. cellule) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. cellule) | | | N (cell/ml) | log |
| | -5 | -6 | | | -5 | -6 | -7 | | |
| Coltura 1 | 688 | 89 | 7.06 x 10 ⁷ | 7.8 | >>300 | >>300 | 319 | 2.90 x 10 ⁹ | 9.5 |
| Coltura 2 | 352 | 108 | 4.18 x 10 ⁷ | 7.6 | 167 | 24 | 2 | 1.74 x 10 ⁷ | 7.2 |
| Coltura 3 | 408 | 93 | 4.55 x 10 ⁷ | 7.7 | >>300 | >>300 | 511 | 4.65 x 10 ⁹ | 9.7 |

| | | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|--------------------|-----|-----|----|----|--------------------|-----|
| Coltura 4 | 708 | 112 | 7.45×10^7 | 7.9 | 333 | 34 | 6 | 3.34×10^7 | 7.5 |
| Coltura 5 | 332 | 71 | 3.66×10^7 | 7.6 | 457 | 79 | 10 | 8.09×10^7 | 7.9 |

Tabella 18.3. Dati relativi alla conta su piastra in PCA per la quantificazione delle cellule planctoniche per i test del biofilm del 2 settembre e 26 settembre (colture incubate a 4°C)

Lo stesso è stato fatto anche per le colture di *Lm113* poste a 30°C. Di seguito vengono riportate le due tabelle contenenti rispettivamente i dati grezzi derivanti dalla lettura allo spettrofotometro per i tre test effettuati nei tre punti temporali scelti e i dati rielaborati (assorbanza media e deviazione standard per ciascuna coltura).

| | | <i>Lm113</i> – 30°C | | | | | |
|-------------------------|------------------|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Replica 6 |
| Inizio (8/07) | Coltura 1 | 0.0685 | 0.0704 | 0.0693 | 0.0729 | 0.0673 | 0.0687 |
| | Coltura 2 | 0.0725 | 0.0738 | 0.0733 | 0.0678 | 0.0752 | 0.0690 |
| | Coltura 3 | 0.1017 | 0.0778 | 0.0785 | 0.0713 | 0.0844 | 0.9062 |
| | Coltura 4 | 0.0855 | 0.0855 | 0.0777 | 0.0784 | 0.0793 | 0.0849 |
| | Coltura 5 | 0.0795 | 0.0742 | 0.0705 | 0.0822 | 0.0903 | 0.0891 |
| | Bianco | 0.0571 | 0.0601 | 0.0600 | 0.0636 | 0.0480 | 0.0613 |
| Metà (2/09) | Coltura 1 | 0.0839 | 0.0707 | 0.0713 | 0.0703 | 0.0805 | 0.0774 |
| | Coltura 2 | 0.1056 | 0.0748 | 0.0760 | 0.0791 | 0.0818 | 0.0930 |
| | Coltura 3 | 0.1123 | 0.0987 | 0.0963 | 0.0849 | 0.0877 | 0.0954 |
| | Coltura 4 | 0.1118 | 0.0895 | 0.0829 | 0.0894 | 0.0754 | 0.1324 |
| | Coltura 5 | 0.0676 | 0.0680 | 0.0883 | 0.1054 | 0.0834 | 0.0876 |
| | Bianco | 0.0878 | 0.0850 | 0.0942 | 0.0915 | 0.0851 | 0.0846 |
| Fine (26/09) | Coltura 1 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 2 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 3 | 0.5260 | 0.1185 | 0.1636 | 0.1206 | 0.1310 | 0.1891 |
| | Coltura 4 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 5 | – | – | – | – | – | – |
| | Bianco | 0.1500 | 0.1470 | 0.1034 | 0.1175 | 0.1172 | 0.1197 |

Tabella 19.1. Dati grezzi ottenuti in seguito alla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di *Lm113* incubate a 30°C (a inizio, metà e fine esperimento)

| | Inizio (8 luglio) | | Metà (2 settembre) | | Fine (26 settembre) | |
|-------------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------------|---------------|
| | Assorbanza media (OD ₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD ₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD ₅₇₀) | Dev. standard |
| Coltura 1 | 0.0112 | 0.0014 | -0.0124 | 0.0049 | – | – |
| Coltura 2 | 0.0136 | 0.0024 | -0.0030 | 0.0095 | – | – |
| Coltura 3 | 0.1616 | 0.2287 | 0.0078 | 0.0066 | 0.0823 | 0.1060 |
| Coltura 4 | 0.0235 | 0.0034 | 0.0089 | 0.0168 | – | – |
| Coltura 5 | 0.0226 | 0.0062 | -0.0047 | 0.0104 | – | – |
| Bianco_{media} | 0.0584 | 0.0039 | 0.0880 | 0.0032 | 0.1258 | 0.0151 |

Tabella 19.2. Valori di assorbanza complessivi ottenuti dal test del biofilm per ciascuna coltura di *Lm113* a 30°C (a inizio, metà e fine esperimento)

Anche per le colture di *Lm113* poste a 30°C, per i due test del biofilm eseguiti a metà e a fine esperimento, sono disponibili i dati relativi alle conte su piastra in PCA, con le quali è stato stimato il numero di cellule planctoniche. Anche in questo caso, per il primo test del biofilm effettuato ad inizio esperimento, questi dati non sono disponibili, avendo scelto di piastrire delle diluizioni troppo concentrate e quindi impossibili da contare.

| <i>Lm113</i> (cellule planctoniche) – 30°C | | | | | | |
|---|-------------------------|-------------|-----|-------------------------|------------------------|-----|
| | 2 settembre | | | 26 settembre | | |
| | Diluizioni (n. cellule) | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. cellule) | N (cell/ml) | log |
| | MADRE | | | -2 | | |
| Coltura 1 | 0 | 0 | – | – | – | – |
| Coltura 2 | 0 | 0 | – | – | – | – |
| Coltura 3 | 0 | 0 | – | 6 | 5.45 x 10 ² | 2.7 |
| Coltura 4 | 0 | 0 | – | – | – | – |
| Coltura 5 | 0 | 0 | – | – | – | – |

Tabella 19.3. Dati relativi alla conta su piastra in PCA per la quantificazione delle cellule planctoniche per i test del biofilm del 2 settembre e 26 settembre (colture incubate a 30°C)

Dopo aver ottenuto i valori di assorbanza media per ciascuna coltura alle due temperature, è stato calcolato il valore di assorbanza_{totale} facendo la media tra i cinque valori di assorbanza di ciascuna coltura per ognuno dei tre punti temporali scelti. A ciascun valore di assorbanza_{totale} è stato associato un errore, ottenuto calcolando la deviazione standard rispetto alla media per ogni punto temporale. Si riporta in seguito una tabella con i dati in questione.

| | <i>Lm113</i> – 4°C | | <i>Lm113</i> – 30°C | |
|---------------------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| | Assorbanza _{totale} | Dev. standard | Assorbanza _{totale} | Dev. standard |
| 8 luglio | 0.1251 | 0.0344 | 0.0465 | 0.0461 |
| 2 settembre | -0.0023 | 0.0028 | -0.0007 | 0.0072 |
| 26 settembre | 0.0666 | 0.0358 | 0.0823 | 0 |

Tabella 20. Valori complessivi di assorbanza ottenuti per *Lm113* in corrispondenza dei tre punti temporali per le due temperature in esame (4°C a sinistra e 30°C a destra)

Si riporta in conclusione un grafico che consente di visualizzare più facilmente l'andamento dei dati riportati all'interno di Tabella 20. Sull'asse delle ascisse viene riportato il tempo (quindi i giorni in cui è stato effettuato il test del biofilm) e sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori di Assorbanza_{totale} (con deviazione standard associata).

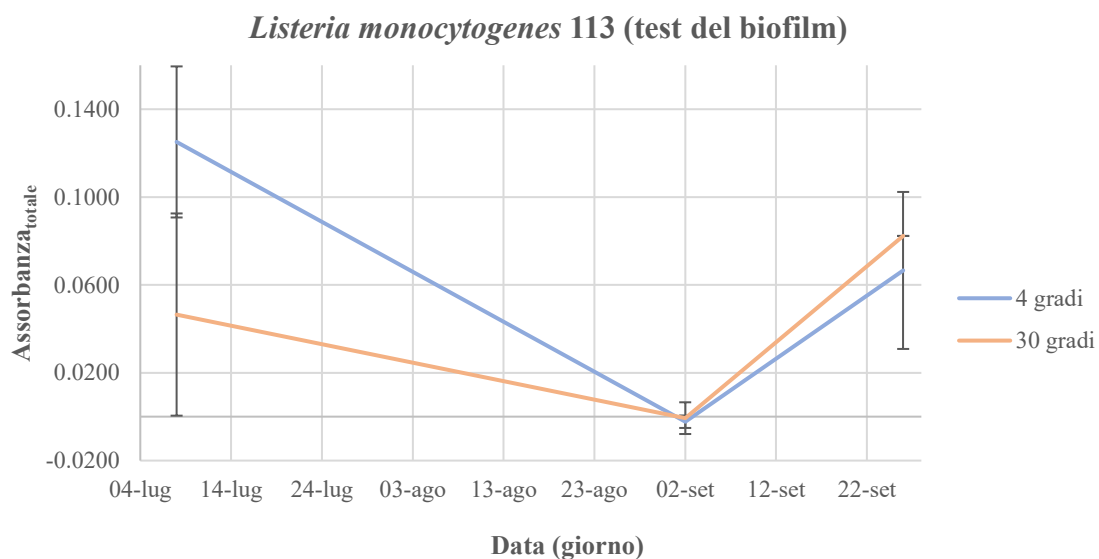


Grafico 14. Andamento dei valori complessivi di assorbanza ottenuti per *Lm113* in corrispondenza dei tre punti temporali per le due temperature in esame (4°C in azzurro e 30°C in rosa)

Listeria monocytogenes 19111

Si riportano in seguito i dati ottenuti dai tre test del biofilm effettuati in corrispondenza dei tre punti temporali scelti per le cinque colture di *Lm19111* poste a 4°C. Inizialmente viene riportata una tabella contenente tutti i dati grezzi ottenuti dalla lettura allo spettrofotometro per i test del biofilm effettuati all'inizio, a metà e alla fine dell'esperimento.

| | | <i>Lm19111 – 4°C</i> | | | | | |
|-------------------------|------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Replica 6 |
| Inizio (8/07) | Coltura 1 | 0.1015 | 0.1276 | 0.1016 | 0.0892 | 0.0673 | 0.0710 |
| | Coltura 2 | 0.0846 | 0.0697 | 0.1033 | 0.0868 | 0.0797 | 0.0632 |
| | Coltura 3 | 0.0783 | 0.0728 | 0.0801 | 0.0782 | 0.0862 | 0.0893 |
| | Coltura 4 | 0.0660 | 0.0703 | 0.0721 | 0.0752 | 0.0698 | 0.0690 |
| | Coltura 5 | 0.0623 | 0.0698 | 0.0675 | 0.0787 | 0.0750 | 0.0662 |
| | Bianco | 0.0529 | 0.0604 | 0.0582 | 0.0593 | 0.0559 | 0.0662 |
| Metà (2/09) | Coltura 1 | 0.0723 | 0.0635 | 0.0629 | 0.0581 | 0.0561 | 0.0542 |
| | Coltura 2 | 0.0587 | 0.0573 | 0.0556 | 0.0533 | 0.0612 | 0.0523 |
| | Coltura 3 | 0.0605 | 0.0617 | 0.0497 | 0.0563 | 0.0515 | 0.0558 |
| | Coltura 4 | 0.0609 | 0.0596 | 0.0654 | 0.0638 | 0.0542 | 0.0547 |
| | Coltura 5 | 0.0637 | 0.0655 | 0.0880 | 0.0674 | 0.0667 | 0.0643 |
| | Bianco | 0.0588 | 0.0629 | 0.0753 | 0.0599 | 0.0584 | 0.0656 |
| Fine (26/09) | Coltura 1 | 0.1513 | 0.0962 | 0.1253 | 0.1062 | 0.1145 | 0.1492 |
| | Coltura 2 | 0.1013 | 0.1051 | 0.2447 | 0.1284 | 0.1144 | 0.1199 |
| | Coltura 3 | 0.1813 | 0.1815 | 0.2317 | 0.1441 | 0.1393 | 0.1395 |
| | Coltura 4 | 0.1132 | 0.1315 | 0.1148 | 0.1345 | 0.1019 | 0.0911 |
| | Coltura 5 | 0.3949 | 0.1028 | 0.1226 | 0.0942 | 0.1694 | 0.1203 |
| | Bianco | 0.1500 | 0.1470 | 0.1034 | 0.1175 | 0.1172 | 0.1197 |

Tabella 21.1. Dati grezzi ottenuti in seguito alla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di *Lm19111* incubate a 4°C (a inizio, metà e fine esperimento)

Successivamente, come visto anche per il ceppo precedente, sono stati calcolati i valori di $\text{bianco}_{\text{media}}$ per ognuno dei tre punti temporali e i valori ottenuti sono stati sottratti ai dati grezzi, in modo tale da ottenere dei valori di assorbanza normalizzati per il bianco. Successivamente, per ogni coltura e per ogni punto temporale, sono stati ricavati i valori di assorbanza media, a cui sono stati associati i valori di deviazione standard rispetto alla media. Nella tabella seguente vengono riportati i dati ottenuti.

| | Inizio (8 luglio) | | Metà (2 settembre) | | Fine (26 settembre) | |
|------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|----------------------|
| | Assorbanza media (OD₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD₅₇₀) | Dev. standard |
| Coltura 1 | 0.0342 | 0.0172 | -0.0023 | 0.0051 | -0.0020 | 0.0182 |
| Coltura 2 | 0.0224 | 0.0104 | -0.0071 | 0.0027 | 0.0098 | 0.0364 |
| Coltura 3 | 0.0220 | 0.0046 | -0.0076 | 0.0036 | 0.0438 | 0.0286 |

| | | | | | | |
|-------------------------------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|
| Coltura 4 | 0.0116 | 0.0022 | -0.0037 | 0.0036 | -0.0113 | 0.0124 |
| Coltura 5 | 0.0111 | 0.0046 | 0.0058 | 0.0062 | 0.0416 | 0.0765 |
| Bianco_{media} | 0.0588 | 0.0032 | 0.0635 | 0.0046 | 0.1258 | 0.0858 |

Tabella 21.2. Valori di assorbanza complessivi ottenuti dal test del biofilm per ciascuna coltura di *Lm19111* a 4°C (a inizio, metà e fine esperimento)

Analogamente a quanto visto per il ceppo precedente, anche in questo caso vengono riportati i dati relativi alle conte su piastra in PCA per la stima del numero delle cellule planctoniche per coltura per i due test del biofilm effettuati a metà e a fine esperimento. Non sono disponibili i dati raccolti durante il test del biofilm eseguito ad inizio esperimento, perché sono state piastrate delle diluizioni troppo concentrate che hanno restituito dei risultati impossibili da leggere. Vengono riportati nella tabella seguente i risultati ottenuti.

| <i>Lm19111</i> (cellule planctoniche) – 4°C | | | | | | | | | |
|--|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|------------------------------------|-----------|-----------|------------------------|------------|
| 2 settembre | | | | | 26 settembre | | | | |
| | Diluizioni (n. cellule) | | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. cellule) | | | N (cell/ml) | log |
| | -5 | -6 | | | -5 | -6 | -7 | | |
| Coltura 1 | >300 | 221 | 2.01 x 10 ⁸ | 8.3 | 343 | 58 | 7 | 5.91 x 10 ⁷ | 7.8 |
| Coltura 2 | 756 | 98 | 7.76 x 10 ⁷ | 7.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | – |
| Coltura 3 | 656 | 78 | 6.67 x 10 ⁷ | 7.8 | 531 | 113 | 22 | 1.23 x 10 ⁸ | 8.1 |
| Coltura 4 | 1404 | 155 | 1.42 x 10 ⁸ | 8.2 | 242 | 27 | 4 | 2.45 x 10 ⁷ | 7.4 |
| Coltura 5 | 952 | 76 | 9.35 x 10 ⁷ | 8.0 | 73 | 12 | 0 | 7.73 x 10 ⁶ | 6.9 |

Tabella 21.3. Dati relativi alla conta su piastra in PCA per la quantificazione delle cellule planctoniche per i test del biofilm del 2 settembre e 26 settembre (colture incubate a 4°C)

Lo stesso procedimento appena descritto per le colture poste a 4°C è stato seguito anche per la lettura dei risultati del test del biofilm per le colture di *Lm19111* poste a 30°C. Di seguito vengono riportate le due tabelle contenenti rispettivamente i dati grezzi derivanti dalla lettura allo spettrofotometro per i tre test effettuati nei tre punti temporali scelti e i dati rielaborati (assorbanza media e deviazione standard per ciascuna coltura).

| <i>Lm19111</i> – 30°C | | | | | | | |
|------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | Replica 1 | Replica 2 | Replica 3 | Replica 4 | Replica 5 | Replica 6 |
| Inizio (8/07) | Coltura 1 | 0.1344 | 0.0699 | 0.0830 | 0.0734 | 0.0734 | 0.0660 |
| | Coltura 2 | 0.0635 | 0.0751 | 0.0693 | 0.0694 | 0.0663 | 0.0632 |
| | Coltura 3 | 0.0566 | 0.0646 | 0.0602 | 0.0692 | 0.0644 | 0.0627 |

| | | | | | | | |
|------------------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Coltura 4 | 0.0585 | 0.0656 | 0.0675 | 0.0692 | 0.0732 | 0.0682 |
| | Coltura 5 | 0.0598 | 0.0604 | 0.0640 | 0.0614 | 0.0632 | 0.0601 |
| | Bianco | 0.0571 | 0.0601 | 0.0600 | 0.0636 | 0.0480 | 0.0613 |
| Metà (2/09) | Coltura 1 | 0.0820 | 0.0976 | 0.0905 | 0.0803 | 0.0754 | 0.0937 |
| | Coltura 2 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 3 | 0.1336 | 0.0853 | 0.0779 | 0.0772 | 0.0696 | 0.0652 |
| | Coltura 4 | 0.0921 | 0.0819 | 0.0713 | 0.0741 | 0.0714 | 0.0697 |
| | Coltura 5 | 0.0809 | 0.2523 | 0.0807 | 0.0773 | 0.0742 | 0.0728 |
| | Bianco | 0.0878 | 0.0850 | 0.0942 | 0.0915 | 0.0851 | 0.0846 |
| Fine (26/09) | Coltura 1 | 0.1268 | 0.1281 | 0.2278 | 0.1118 | 0.1585 | 0.1012 |
| | Coltura 2 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 3 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 4 | – | – | – | – | – | – |
| | Coltura 5 | – | – | – | – | – | – |
| | Bianco | 0.1500 | 0.1470 | 0.1034 | 0.1175 | 0.1172 | 0.1197 |

Tabella 22.1. Dati grezzi ottenuti in seguito alla lettura allo spettrofotometro, relativi alle cinque colture di *Lm19111* incubate a 30°C (a inizio, metà e fine esperimento)

| | Inizio (8 luglio) | | Metà (2 settembre) | | Fine (26 settembre) | |
|-------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|----------------------|
| | Assorbanza media (OD₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD₅₇₀) | Dev. standard | Assorbanza media (OD₅₇₀) | Dev. standard |
| Coltura 1 | 0.0250 | 0.0170 | -0.0015 | 0.0074 | 0.0166 | 0.0339 |
| Coltura 2 | 0.0094 | 0.0035 | – | – | – | – |
| Coltura 3 | 0.0046 | 0.0031 | -0.0032 | 0.0164 | – | – |
| Coltura 4 | 0.0087 | 0.0033 | -0.0113 | 0.0068 | – | – |
| Coltura 5 | 0.0031 | 0.0014 | 0.0183 | 0.0486 | – | – |
| Bianco_{media} | 0.0584 | 0.0039 | 0.0880 | 0.0032 | 0.1258 | 0.0151 |

Tabella 22.2. Valori di assorbanza complessivi ottenuti dal test del biofilm per ciascuna coltura di *Lm19111* a 30°C (a inizio, metà e fine esperimento)

Si riportano in seguito i risultati relativi alla conta su piastra in PCA che consente di stimare il numero di cellule planctoniche per coltura. Anche in questo caso, come per le colture di *Lm19111* poste a 4°C e per il ceppo precedente, non sono disponibili i dati relativi al primo test del biofilm avendo compiuto degli errori durante la scelta delle diluizioni da piastrire. Si riportano, quindi, solamente i risultati relativi ai test effettuati a metà e fine esperimento.

| Lm19111 (cellule planctoniche) – 30°C | | | | | | |
|--|-----------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-----|
| 2 settembre | | | 26 settembre | | | |
| Diluizioni (n. cellule) | N (cell/ml) | log | Diluizioni (n. cellule) | N (cell/ml) | log | |
| MADRE | | | -2 | | | |
| Coltura 1 | 59 | 2.68 x 10 ² | 2.4 | 866 | 7.87 x 10 ⁴ | 4.9 |
| Coltura 2 | – | – | – | – | – | – |
| Coltura 3 | 0 | 0 | – | – | – | – |
| Coltura 4 | 0 | 0 | – | – | – | – |
| Coltura 5 | 0 | 0 | – | – | – | – |

Tabella 22.3. Dati relativi alla conta su piastra in PCA per la quantificazione delle cellule planctoniche per i test del biofilm del 2 settembre e 26 settembre (colture incubate a 30°C)

Analogamente a quanto visto per il ceppo precedente, anche per il ceppo *Lm19111* si riporta una tabella contenente i valori di Assorbanza_{totale} per ciascun punto temporale e per le due temperature in esame (4°C e 30°C). A ciascun valore di Assorbanza_{totale} è stato associato il valore di deviazione standard rispetto alla media.

| | Lm19111 – 4°C | | Lm19111 – 30°C | |
|---------------------|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------|
| | Assorbanza_{totale} | Dev. standard | Assorbanza_{totale} | Dev. standard |
| 8 luglio | 0.0203 | 0.0071 | 0.0102 | 0.0059 |
| 2 settembre | -0.0030 | 0.0038 | 0.0006 | 0.0089 |
| 26 settembre | 0.0164 | 0.0210 | 0.0166 | 0 |

Tabella 23. Valori complessivi di assorbanza ottenuti per *Lm19111* in corrispondenza dei tre punti temporali per le due temperature in esame (4°C a sinistra e 30°C a destra)

Per concludere, si riporta un grafico che rappresenta i dati appena riportati in Tabella 23. Sull'asse delle ascisse è stato riportato il tempo (quindi i giorni in cui è stato effettuato il test del biofilm), mentre sull'asse delle ordinate vengono riportati i valori di Assorbanza_{totale} (con deviazione standard associata).

Listeria monocytogenes 19111 (test del biofilm)

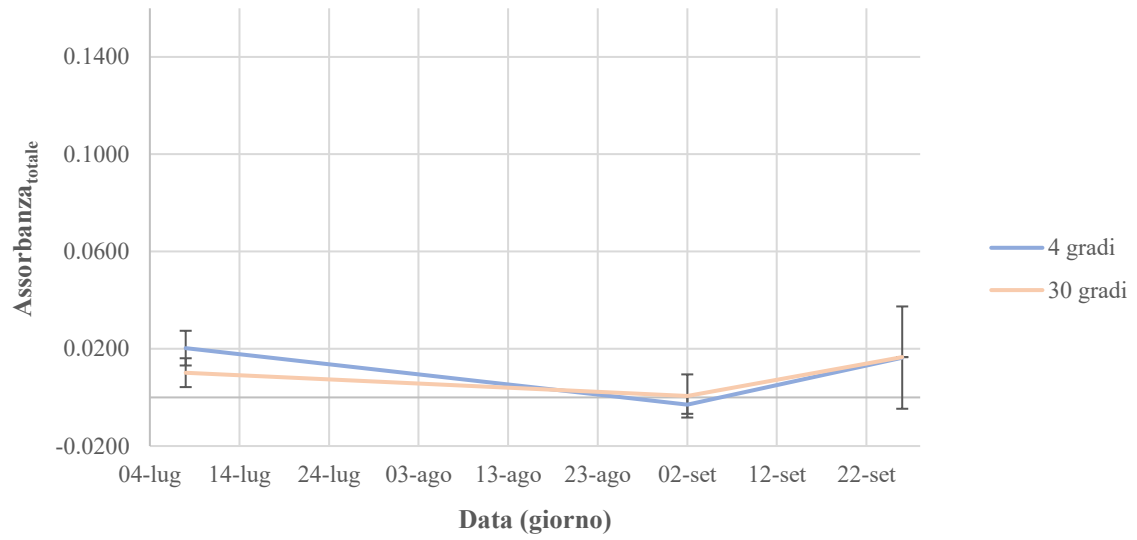


Grafico 15. Andamento dei valori complessivi di assorbanza ottenuti per Lm19111 in corrispondenza dei tre punti temporali per le due temperature in esame (4°C in azzurro e 30°C in rosa)

Discussione

Negli ultimi anni è stato dimostrato da vari studi che *Listeria monocytogenes* è in grado di persistere per lunghi periodi di tempo (addirittura per anni) all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti. La persistenza di questo patogeno all'interno degli ambienti dell'industria alimentare favorisce la contaminazione dei prodotti alimentari stessi, che sono a loro volta i principali veicoli per la trasmissione di *L. monocytogenes* all'uomo (Ferreira *et al.*, 2014). Proprio considerando quanto spesso è stata osservata la persistenza di questo patogeno all'interno degli ambienti dell'industria alimentare, con questa tesi si è deciso di approfondire le conoscenze a riguardo. Per fare ciò, sono state messe a punto delle colture a lungo termine (o *long-term cultures*) di tre ceppi di *L. monocytogenes* in MBM, un terreno povero di nutrienti a composizione principalmente salina, con lo scopo di mimare le condizioni ambientali delle superfici su cui il patogeno può persistere.

Nella fase antecedente alla messa a punto delle colture a lungo termine, è stata necessaria la costruzione di una curva di crescita per ciascuno dei tre ceppi in esame. La costruzione di queste curve ha avuto come scopo principale quello di individuare dopo quante ore a partire dall'inoculo in TSB+YE le colture raggiungevano la fase pre-stazionaria. A partire dalle colture in fase pre-stazionaria, quindi, è stato eseguito l'inoculo vero e proprio in MBM per la successiva messa a punto delle colture a lungo termine. È stato scelto di eseguire l'inoculo in corrispondenza di questa fase in modo tale da avere a disposizione un numero elevato di cellule ancora in fase di attiva replicazione, basandosi anche su quanto riportato da studi preesistenti (Shoemaker *et al.*, 2021; Gross *et al.*, 2020).

Le *long-term cultures* ottenute sono state poste ad incubare a due diverse temperature con lo scopo di simulare ulteriormente quelle che sono le condizioni ambientali che il patogeno incontra all'interno degli impianti di lavorazione degli alimenti. Cinque repliche per ceppo sono state incubate a 30°C e cinque repliche sono state incubate a 4°C. La temperatura di 30°C rappresenta l'*optimum* di crescita per *L. monocytogenes*: le cinque repliche incubate a questa temperatura, quindi, sono state poste in presenza di un'unica situazione di stress, determinata dall'utilizzo del terreno MBM povero di nutrienti. Al contrario, le cinque repliche incubate a 4°C sono state poste in una condizione duplice di stress (carenza di nutrienti e stress da freddo), in modo tale da simulare le condizioni ambientali che si ritrovano all'interno di un frigorifero e osservare la capacità del patogeno di sopravvivere in questo contesto. *L. monocytogenes*, essendo un microrganismo psicrotollerante, è in grado di sopravvivere in presenza di basse temperature all'interno di ambienti refrigerati, come dimostrato da

vari studi, ma resta da dimostrare per quanto tempo questa sopravvivenza si protragga (Matle *et al.*, 2020; Gurreesch *et al.*, 2016; Leong *et al.*, 2014).

Dopo aver ottenuto un totale di 30 colture a lungo termine (10 per ceppo) e averne incubate una metà a 4°C e una metà a 30°C, si è cominciato a monitorarne l'andamento nel tempo, in primo luogo attraverso conta su piastra. Per tutti e tre i ceppi di *L. monocytogenes* in esame, si è scelto di iniziare il monitoraggio ricorrendo all'utilizzo di un terreno cromogeno selettivo (ALOA). L'utilizzo di questo terreno dovrebbe fornire una certezza in più riguardo il fatto che si stia effettivamente monitorando la sopravvivenza di cellule di *L. monocytogenes*. Non si può escludere, infatti, che all'interno delle colture in esame siano presenti in co-coltura anche delle cellule contaminanti (entrate accidentalmente nelle Falcon). Utilizzando questo terreno selettivo, è possibile evitare di sovrastimare accidentalmente le conte: i contaminanti, se presenti, non dovrebbero crescere in ALOA.

Nel caso del ceppo *Lm246*, sono emersi fin da subito dei risultati inattesi in seguito all'osservazione degli esiti delle conte su piastra. Dai risultati ottenuti è stato dedotto che all'interno di tutte le Falcon fossero presenti cellule batteriche vitali (come dimostrato dalla prova di crescita in AS), ma che solo in una Falcon (coltura 3 incubata a 30°C) fossero effettivamente presenti cellule di *L. monocytogenes* vitali, come dimostrato dai risultati di crescita in ALOA. Per verificare ulteriormente la presenza di *L. monocytogenes* all'interno delle dieci colture, è stata effettuata una PCR real-time che ha confermato quanto osservato attraverso le conte su piastra. Con quasi assoluta certezza, quindi, è possibile dichiarare la presenza di cellule di batteri contaminanti all'interno delle colture che, nella maggior parte dei casi, hanno preso il sopravvento rispetto a *L. monocytogenes*, superandola in numero. Basandosi anche su quanto osservato nei risultati della PCR real-time relativi agli estratti delle colture di *Lm246* del primo giorno di esperimento, è probabile che questa contaminazione fosse già presente a livello del pre-inoculo o addirittura a livello della piastra di AS su cui il ceppo *Lm246* è stato coltivato a inizio esperimento. La presenza di questi contaminanti potrebbe essere stata responsabile anche della crescita più rapida di questo ceppo rispetto agli altri durante la creazione delle curve di crescita e della più elevata concentrazione raggiunta da questo ceppo a livello di pre-inoculo rispetto agli altri due ceppi di *L. monocytogenes* studiati.

Nonostante la presenza di contaminazioni abbia determinato l'interruzione del monitoraggio di tutte le colture del ceppo *Lm246* (sia di quelle a 4°C che di quelle a 30°C), fortunatamente gli altri due ceppi in esame hanno fornito dei risultati molto interessanti durante i tre mesi di esperimento. Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalle conte su piastra per le colture incu-

bate a 4°C, per entrambi i ceppi sono stati osservati dei comportamenti praticamente analoghi. Nel corso delle 12 settimane di esperimento, infatti, sia le cinque repliche di *Lm113* che le cinque repliche di *Lm19111* poste a 4°C hanno mantenuto una concentrazione di cellule vitali praticamente costante. È da sottolineare il fatto che per entrambi i ceppi il monitoraggio attraverso conta su piastra durante le 12 settimane di esperimento è stato condotto interamente su ALOA. Nonostante le colture contenessero cellule potenzialmente stressate dalla carenza di nutrienti e dalle basse temperature di incubazione, le colonie di *L. monocytogenes* hanno continuato a crescere sul terreno selettivo, senza la necessità di ricorrere ad un terreno più permissivo e nutriente (come il PCA) con il passare del tempo. Si è potuto comunque osservare che la dimensione delle colonie, che è cambiata nel corso delle 12 settimane: a parità di tempo di incubazione, è stata osservata la comparsa di colonie molto piccole dopo circa la sesta settimana di monitoraggio. È possibile affermare con quasi assoluta certezza che la comparsa di queste colonie di dimensioni inferiori rispetto alle prime settimane di esperimento sia stata una conseguenza del duplice stress a cui le cellule di *L. monocytogenes* sono state sottoposte. Basandosi su quanto riportato in letteratura, si può ipotizzare che le cellule presenti in questa fase (dopo circa cinque/sei settimane di esperimento) siano effettivamente *persisters*: all'interno di vari studi, infatti, si fa riferimento al cambiamento morfologico che può caratterizzare questa tipologia di cellule (Matereke & Okoh, 2020; Buchanan *et al.*, 2017; Finkel, 2006).

Quanto osservato riguardo la persistenza delle colture di *Lm113* e *Lm19111* incubate a 4°C risulta in accordo con quanto riportato in studi precedenti. Dykes (1999), ad esempio, ha dimostrato la capacità di tre ceppi (su quattro in esame) di *L. monocytogenes* di persistere in un ambiente povero di nutrienti in presenza di basse temperature (4°C) per un totale di quattro settimane. Anche in questo caso, come osservato nell'ambito di questa tesi, durante le settimane di esperimento la concentrazione di batteri vitali nel tempo è rimasta costante o è diminuita leggermente per tre ceppi su quattro in esame.

Per quanto riguarda le *long-term cultures* di questi due ceppi incubate a 30°C, i risultati ottenuti si discostano di molto rispetto a quanto emerso dall'osservazione delle colture a 4°C. Anche in questo caso, si è deciso di prediligere la conta su piastra in ALOA e di iniziare quindi il monitoraggio ricorrendo a questo terreno selettivo per entrambi i ceppi, osservando però una crescita effettiva su questo terreno solo durante le prime settimane di esperimento. Per entrambi i ceppi, durante le prime due settimane circa, è stato osservato un calo notevole delle conte (maggiore ai 2 logaritmi), che ha riguardato tutte le repliche in esame. In seguito a questa osservazione, ci si è chiesti a cosa fosse effettivamente dovuto questo calo nelle

conte. È stata formulata l'ipotesi che le cellule delle colture fossero talmente stressate dalla carenza di nutrienti da aver perso la capacità di crescere su un terreno non particolarmente permissivo come l'ALOA. A tal proposito, quindi, si è deciso di affiancare per alcuni monitoraggi la conta su piastra in ALOA con la conta su piastra in PCA (terreno generico e non selettivo). I risultati ottenuti non hanno mostrato particolari differenze nell'utilizzo dei tre terreni per tre repliche su cinque di *Lm113* e per tre repliche su quattro di *Lm19111*. Queste repliche, infatti, sono andate incontro ad un azzeramento totale delle conte, sia in seguito a conta su piastra in ALOA che in seguito a conta su piastra in PCA. Al contrario, le repliche rimanenti (coltura 3 e 5 di *Lm113* e coltura 1 di *Lm19111*) hanno mostrato un azzeramento delle conte in ALOA, mentre questo azzeramento non è stato osservato in PCA. In particolare, la coltura numero 5 di *Lm113* ha mostrato crescita su PCA fino alla settima settimana con un andamento delle conte sempre in calo, fino all'azzeramento totale. Al contrario, invece, per la coltura numero 3 di *Lm113* e la coltura numero 1 di *Lm19111* è stata osservata crescita su PCA fino alla dodicesima settimana. Queste due colture, inoltre, hanno mostrato un andamento delle conte inaspettato, non in continuo calo (come visto per le repliche precedenti poste a 30°C), ma molto altalenante, con oscillazioni continue tra concentrazioni di cellule vitali apparentemente molto basse e concentrazioni molto più alte. È possibile che anche in questo caso, come visto in precedenza per le *long-term cultures* di *L. monocytogenes* incubate a 4°C, ci si trovi di fronte alla presenza di *persisters*. Queste cellule, infatti, oltre a rimanere vitali nel tempo in presenza di stress da carenza di nutrienti potrebbero ritrovarsi in una forma aggregata, analogamente a quanto osservato nel caso di altre cellule persistenti in studi precedenti (Finkel, 2006). Proprio la presenza di aggregati cellulari potrebbe aver reso complicato il prelievo di campioni con concentrazioni cellulari sempre identiche in corrispondenza dei vari monitoraggi, determinando l'andamento altalenante delle conte. Anche nello studio di Sibanda & Buys (2022), si riporta il fatto che la formazione di aggregati potrebbe rappresentare una risposta del patogeno allo stress a cui questo è sottoposto. In particolare, la proteina ActA sembra rivestire un ruolo importante nell'aggregazione cellulare. L'espressione di questa proteina è regolata da PrfA e aumenta proprio in presenza di stress, quale ad esempio la carenza di nutrienti.

Per quanto riguarda le colture che hanno mostrato un azzeramento delle conte a partire dalla terza/quarta settimana, invece, sono state formulate due ipotesi: che le cellule delle colture fossero tutte andate incontro a morte o che le cellule di *L. monocytogenes* si trovassero in uno stato VBNC (Viable But Nonculturable). Secondo quanto riportato da Besnard *et al.* (2000) e Widemann *et al.* (2021), la messa a punto di colture di *L. monocytogenes* in un

ambiente povero di nutrienti, come quello utilizzato nell'ambito di questa tesi, sembra effettivamente indurre lo stato VBNC. In particolare, nello studio di Besnard *et al.* (2000) per la messa a punto delle colture dei quattro ceppi di *L. monocytogenes* in esame è stata utilizzata la *microcosm water*, acqua sterile filtrata e deionizzata con aggiunta o meno di NaCl (7%) e pH attorno a 6. Le colture, nel caso specifico di questo esperimento, sono state incubate a 20°C e monitorate nel corso di 10 settimane. Il numero di cellule di *L. monocytogenes* coltivabili su terreno non selettivo è calato fino ad azzerarsi nel giro di 4-8 settimane a seconda delle condizioni sperimentali utilizzate e a seconda del ceppo in esame. L'effettiva transizione delle cellule di *L. monocytogenes* ad uno stato VBNC è stata verificata mediante *Direct Viable Counts* (DVC) e *CTC-DAPI double staining*. Nel caso del metodo DVC, al campione in esame viene aggiunta una quantità limitata di nutrienti (sottoforma di estratto di lievito) insieme ad un antibiotico in grado di inibire la replicazione del DNA (ciprofloxacina) e il tutto viene incubato a 37°C per 7 ore. Le cellule vitali e metabolicamente attive, in risposta alla presenza di nutrienti, possono iniziare a crescere, ma la divisione cellulare è impedita dalla presenza dell'antibiotico. Queste cellule, quindi, appaiono ingrossate (allungate circa il doppio della normale lunghezza) e possono essere visualizzate e contate direttamente al microscopio in seguito a colorazione (mediante un colorante fluorescente). Il *CTC-DAPI double staining*, invece, viene utilizzato spesso in combinazione con il metodo DVC. Viene sfruttata la capacità delle cellule ancora metabolicamente attive di convertire il CTC (un sale di tetrazolio) in formazano, un precipitato in grado di emettere fluorescenza. In aggiunta, si ricorre anche all'utilizzo del DAPI, un colorante in grado di passare attraverso le membrane cellulari intatte e di legarsi al DNA batterico. Il *CTC-DAPI double staining* consente di rilevare la presenza di cellule e di discriminare le cellule morte da quelle ancora metabolicamente attive (Besnard *et al.*, 2000; Widemann *et al.*, 2021). Utilizzando questi due metodi (DVC e *CTC-DAPI double staining*), quindi, Besnard *et al.* (2000) ha osservato l'entrata nello stato VBNC solamente di due ceppi di *L. monocytogenes* sui quattro in esame, arrivando alla conclusione che le condizioni necessarie per indurre questo stato di dormienza fossero ceppo-dipendenti.

Esiste dunque la possibilità che anche le colture per cui è stato osservato un azzeramento delle conte all'interno di questa tesi siano effettivamente andate incontro ad una transizione a stato VBNC, nonostante la diversa temperatura di incubazione utilizzata rispetto allo studio appena descritto. Per ottenere delle certezze in più, sarebbe stato necessario eseguire ulteriori test, ricorrendo ad esempio al metodo DVC (anche se non particolarmente indicato a causa dell'utilizzo di antibiotici) o al *CTC-DAPI double staining*. Un'altra alternativa sarebbe

potuta essere la PCR real-time con PMA (*propidium monoazide*), che costituisce una delle metodologie maggiormente utilizzate per la rilevazione delle cellule in uno stato VBNC (come descritto in precedenza nel paragrafo 2.4 dell'Introduzione).

Le considerazioni emerse dall'osservazione dei risultati ottenuti tramite conta su piastra sono state ulteriormente rafforzate dai dati ottenuti mediante l'esecuzione della PCR real-time in corrispondenza di tre punti temporali nell'arco delle 12 settimane di esperimento. Anche la PCR real-time ha consentito di avere un'idea riguardo l'andamento delle colture nel tempo attraverso la stima della quantità di cellule di *L. monocytogenes* presenti nei vari campioni. È da sottolineare il fatto che questo tipo di analisi non consente di discriminare tra cellule di *L. monocytogenes* vitali e cellule di *L. monocytogenes* morte: infatti, durante la reazione di PCR real-time vengono amplificate tutte le sequenze riconducibili al gene in esame, indipendentemente dal fatto che queste si trovino all'interno di cellule vive, all'interno di cellule morte o disperse nell'ambiente extracellulare.

Per quanto riguarda le colture di *Lm113* e *Lm19111* incubate a 4°C, combinando i risultati restituiti dai valori di *threshold cycle* (Ct) complessivi con i risultati ottenuti in seguito a conta su piastra, è possibile ipotizzare che da inizio a metà esperimento le cellule di *L. monocytogenes* di entrambi i ceppi si siano ritrovate in una fase chiamata *long-term stationary phase* (LTSP). Questa fase è tipica delle colture batteriche *in batch* che vengono incubate per periodi prolungati. Secondo Finkel (2006) e Avrani *et al.* (2017), in risposta a stress quali l'esaurimento delle risorse nutritive, è possibile osservare un'aumentata frequenza di mutazioni all'interno della popolazione batterica sottoposta a tale stress. Queste mutazioni solitamente conferiscono un vantaggio in termini di sopravvivenza, a discapito della capacità di crescere esponenzialmente. Visto l'aumento di materiale genetico riconducibile a *L. monocytogenes* all'interno delle colture dei ceppi in esame durante la prima fase di esperimento, è possibile che le cellule vitali presenti all'interno delle varie repliche abbiano continuato a replicarsi (anche se in maniera più blanda rispetto alla fase di crescita esponenziale) e che contemporaneamente una parte di queste cellule sia andata incontro a morte o abbia effettuato una transizione a stato VBNC.

Nella seconda metà dell'esperimento, invece, per il ceppo *Lm19111* l'andamento si è mantenuto in linea con quanto osservato durante la prima parte di esperimento. Al contrario, per il ceppo *Lm113* il quantitativo di materiale genetico riconducibile a *L. monocytogenes* presente all'interno delle colture è diminuito, quindi è possibile che il DNA di alcune cellule morte in precedenza sia stato in qualche modo degradato o frammentato e non sia stato di

conseguenza oggetto di amplificazione durante la reazione di PCR. La “scoparsa” di questo materiale genetico potrebbe essere imputabile al verificarsi di un fenomeno introdotto dallo studio di Shoemaker *et al.* (2021) secondo il quale in presenza di condizioni ambientali particolarmente ostili le cellule batteriche possono adottare una strategia di sopravvivenza basata sulla necrofagia: le cellule morte presenti nell’ambiente di coltura, infatti, potrebbero potenzialmente diventare nutrimento per le cellule stressate ancora in vita.

La PCR real-time è stata utilizzata anche per monitorare l’andamento delle colture di *Lm113* e di *Lm19111* poste a 30°C in corrispondenza di tre punti temporali nel corso delle 12 settimane di esperimento. Per entrambi i ceppi di *L. monocytogenes* in esame, durante la prima metà dell’esperimento, è stato osservato un leggero aumento del materiale genetico riconducibile al patogeno all’interno delle varie repliche, associato ad un calo netto delle conte su piastra. Come ipotizzato in precedenza basandosi unicamente sulle conte, è possibile che le cellule di *L. monocytogenes* abbiano smesso di replicarsi (o si siano replicate in maniera molto blanda) e che un numero abbastanza abbondante di queste cellule sia andato incontro a morte o a transizione a stato VBNC. I dati derivanti dalla PCR real-time relativi alla seconda metà di esperimento, invece, non vengono presi in considerazione, poiché riguardano un’unica replica per ceppo e sono quindi poco significativi da un punto di vista statistico.

Per concludere la discussione di tutti i risultati ottenuti nell’ambito di questa tesi, è opportuno riportare quanto emerso dal test del biofilm effettuato per i ceppi *Lm113* e *Lm19111* in corrispondenza di tre punti temporali nell’arco delle 12 settimane di esperimento. Per il ceppo *Lm246* il test del biofilm è stato eseguito solamente una volta, all’inizio dell’esperimento, prima di notare la presenza di una possibile contaminazione.

Per quanto riguarda il ceppo *Lm113*, sia nel caso dei ceppi incubati a 4°C che nel caso dei ceppi incubati a 30°C, i valori di assorbanza finali sono prossimi allo zero, con dei picchi leggermente più elevati in corrispondenza dell’inizio e della fine dell’esperimento, come è possibile osservare nel *Grafico 14*. In corrispondenza di questi picchi, però, si registra una deviazione standard dei singoli valori rispetto alla media particolarmente elevata, rendendo il dato medio compreso entro un ampio range e potenzialmente prossimo allo zero.

Un ragionamento analogo può essere fatto anche per il test del biofilm del ceppo *Lm19111*. Per entrambe le temperature di incubazione e per tutti e tre i punti temporali in cui il test è stato effettuato sono stati raccolti dei dati di assorbanza ancora più prossimi allo zero di quelli del ceppo precedente. Come è possibile osservare anche all’interno del *Grafico 15*, i valori di deviazione standard rispetto all’assorbanza media dei singoli punti sono più

contenuti rispetto al ceppo *Lm113*, ma rendono ugualmente il valore medio potenzialmente ancora più prossimo allo zero.

Al valore di assorbanza medio ottenuto per ogni ceppo incubato alle due diverse temperature in corrispondenza dei tre punti temporali in cui il test è stato eseguito è stato associato anche un valore log, corrispondente alla concentrazione delle cellule planctoniche presenti. Questi valori non sono stati considerati nell'interpretazione del test del biofilm, in quanto sono state rilevate delle variazioni piuttosto ampie tra le concentrazioni delle varie repliche.

Nel complesso, quindi, soprattutto considerando le colture di *L. monocytogenes* incubate a 4°C e alcune colture incubate a 30°C che potrebbero verosimilmente contenere delle cellule persistenti, non è stata riportata alcuna osservazione significativa riguardo un'aumentata capacità di formare biofilm. Quanto ottenuto sembra risultare in accordo con quanto riportato nello studio di Djordjevic *et al.* (2002), in cui non è stata riportata alcuna differenza significativa nella capacità di formare biofilm tra ceppi sporadici e persistenti di *L. monocytogenes*. Poiché gli studi a riguardo restituiscono dei risultati molto contrastanti, però, potrebbe essere opportuno approfondire ulteriormente l'argomento, magari testando differenti superfici di adesione. I diversi materiali su cui il patogeno si ritrova, infatti, sembrano influenzare in maniera importante la capacità di *L. monocytogenes* di formare biofilm (Buchanan *et al.*, 2017).

Conclusione

In conclusione, è possibile affermare che i risultati ottenuti in seguito al lavoro sperimentale descritto in questa tesi si sono rivelati molto interessanti, ma necessitano di numerosi approfondimenti futuri. In primo luogo, si rende necessaria la ripetizione di tutti i test effettuati durante i tre mesi di esperimento per il ceppo *Lm246*, il cui monitoraggio è stato interrotto precocemente a causa della potenziale presenza di batteri contaminanti.

Per quanto riguarda i due ceppi rimanenti, invece, è stato osservato che le colture incubate a 4°C sembrano effettivamente persistere per almeno 12 settimane, in presenza delle condizioni sperimentali adottate nell'ambito di questa tesi. In particolare, dopo circa 5 settimane di incubazione in presenza di basse temperature, le cellule di *L. monocytogenes* appartenenti ai due ceppi in esame sembrano entrare realmente in uno stato di dormienza associato ad una crescita apparentemente nulla o comunque molto ridotta, come osservato in seguito all'esecuzione della PCR real-time. Rimane da chiarire se una piccola porzione delle colture incubate a 4°C sia entrata nello stato di dormienza più profondo (VBNC) oppure sia andata semplicemente incontro a morte.

Per quanto riguarda le colture di *Lm113* e *Lm19111* incubate a 30°C, queste sembrano essere maggiormente soggette allo stress determinato dalla carenza di nutrienti, nonostante si trovino in presenza di una temperatura ottimale di crescita. È possibile che *L. monocytogenes* possa trarre vantaggio in termini di sopravvivenza e persistenza dall'esposizione a stress multipli, come accade nel caso delle colture incubate a 4°C, attraverso un meccanismo di *cross-resistance* (Matereke & Okoh, 2020). Questo aspetto resta sicuramente da verificare e chiarire con ulteriori studi.

In generale, sia per le colture incubate a 4°C che soprattutto per quelle incubate a 30°C, rimane sicuramente da chiarire l'importanza dello stato VBNC: all'interno di questa tesi, infatti, è stata ipotizzata in vari momenti la transizione in questo stato di dormienza, senza però poterla effettivamente verificare. In futuro, quindi, sarebbe sicuramente opportuno svolgere degli ulteriori test che consentano di accertare la presenza di cellule nello stato VBNC. Oltre ad accertare la presenza di questa tipologia di cellule, sarebbe opportuno anche chiarirne la pericolosità nell'ambito dell'industria alimentare, indagando ulteriormente la capacità di queste cellule di rianimarsi e la loro virulenza.

In aggiunta, rimangono ancora da chiarire i meccanismi molecolari che hanno determinato la sopravvivenza nel corso dell'esperimento soprattutto delle colture poste a 4°C e di alcune sporadiche repliche poste a 30°C che hanno continuato a mostrare crescita per 12 settimane.

A tal proposito, è opportuno segnalare il fatto che settimanalmente durante i tre mesi di monitoraggi sono stati conservati 100 µl di campione per ciascuna coltura con lo scopo di eseguire un futuro sequenziamento. Questo sequenziamento potrebbe fornire delle ulteriori informazioni riguardo la presenza di eventuali mutazioni insorte durante i tre mesi di monitoraggio, che potrebbero aver influito in qualche modo sulla capacità di persistenza o sull'andamento e la crescita dei ceppi in esame.

In generale, il tema trattato all'interno di questa tesi risulta estremamente attuale, anche alla luce dei recenti casi di focolai di listeriosi. Risulta di centrale importanza sfruttare i risultati ottenuti in laboratorio per arrivare a capire sempre più il comportamento di *L. monocytogenes*, non solo all'interno dell'industria alimentare ma anche all'interno delle case dei consumatori.

Bibliografia

- Abee, T., Koomen, J., Metselaar, K. I., Zwietering, M. H., & den Besten, H. M. (2016). Impact of Pathogen Population Heterogeneity and Stress-Resistant Variants on Food Safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1-18.
- Afari, G. K., & Hung, Y.-C. (2018). Detection and Verification of the Viable but Nonculturable (VBNC) State of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* Using Flow Cytometry and Standard Plating. *Journal of Food Science*, 1913-1920.
- Avrani, S., Bolotin, E., Katz, S., & Hershberg, R. (2017). Rapid Genetic Adaptation during the First Four Months of Survival under Resource Exhaustion. *Molecular Biology and Evolution*, 1758-1769.
- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of Bacteriology*, 1-15.
- Beliaz, A., Sullivan, G., Wiedemann, M., & Ivanek, R. (2022). Factors that contribute to persistent *Listeria* in food processing facilities and relevant interventions: A rapid review. *Food Control*, 1-12.
- Besnard, V., Federighi, M., & Cappelier, J. M. (2000). Evidence of Viable But Non-Culturable state in *Listeria monocytogenes* by direct viable count and CTC-DAPI double staining. *Food Microbiology*, 697-704.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 7336-7342.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 1-13.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., & McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2950-2958.

- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., & Liao, X. (2019). Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 149-183.
- Dykes, G. (1999). Physical and metabolic causes of sub-lethal damage in *Listeria monocytogenes* after long-term chilled storage at 4°C. *Journal of Applied Microbiology*, 915-922.
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal* , 1-324.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 150-170.
- Finkel, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews*, 113-120.
- Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, 453-464.
- Foong, S. C., & Dickson, J. S. (2004). Survival and Recovery of Viable but Nonculturable *Listeria monocytogenes* Cells in a Nutritionally Depleted Medium. *Journal of Food Protection*, 1641-1645.
- Gross, J., Avrani, S., Katz, S., Hilau, S., & Hershberg, R. (2020). Culture Volume Influences the Dynamics of Adaptation under Long-Term Stationary Phase. *Genome Biology and Evolution*, 2292-2301.
- Gupta, P., & Adhikari, A. (2022). Novel Approaches to Environmental Monitoring and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Production Facilities. *Foods*, 1-27.
- Gurresch, A., Gerner, W., Pin, C., Wagner, M., & Hein, I. (2016). Evidence of metabolically active but non-culturable *Listeria monocytogenes* in long-term growth at 10 degrees. *Research in Microbiology*, 334-343.
- Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 1-11.

- Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. *Advances in Food and Nutrition Research*, 1-33.
- Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A., & Jordan, K. (2014). Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*, 1-8.
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 645-659.
- Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell*, 539-548.
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: a review. *Pathogens*, 1-12.
- Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 1-20.
- Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 75-90.
- Murray, E., Webb, R., & Swann, M. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 407-439.
- Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol*, 5273-5287.
- Orsi, R. H., den Bakker, H. C., & Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 79-96.
- Osek, J., Lachtara, B., & Wiczorek, K. (2022). *Listeria monocytogenes* - How This Pathogen Survives in Food-Production Environments. *Frontiers in Microbiology*, 1-21.

- Ottaviani, F., Ottaviani, M., & Agosti, M. (1997). Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. *Industrie alimentari*, 888-895.
- Pamer, E. G. (2004). Immune response to *Listeria monocytogenes*. *Nature*, 812-823.
- Pepper, I., Gerba, C., & Gentry, T. (2015). *Environmental Microbiology*. Academic Press.
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature*, 32-46.
- Rawool, D. B., Doijad, S. P., Poharkar, K. V., Negi, M., Kale, S. B., Malik, S. S., . . . Barbuddhe, S. B. (2016). A multiplex PCR for detection of *Listeria monocytogenes* and its lineages. *Journal of Microbiological Methods*, 144-147.
- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. (2005). *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L 338/1-26.
- Roberts, A. J., Williams, S. K., Wiedmann, M., & Nightingale, K. K. (2009). Some *Listeria monocytogenes* Outbreak Strains Demonstrate Significantly Reduced Invasion, inA Transcript Levels, and Swarming Motility In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology* , 5647-5658.
- Ryser, E. R. (2021). *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press.
- Sauders, B. D., Sanchez, M. D., Rice, D. H., Corby, J., Stich, S., Fortes, E. D., . . . Wiedmann, M. (2009). Prevalence and molecular diversity of *Listeria monocytogenes* in retail establishments. *Journal of Food Protection*, 2337-2349.
- Shoemaker, W. R., Jones, S. E., Muscarella, M. E., Behringer, M. G., Lehmkuhl, B. K., & Lennon, J. T. (2021). Microbial population dynamics and evolutionary outcomes under extreme energy limitation. *PNAS*, 1-8.
- Sibanda, T., & Buys, E. M. (2022). *Listeria monocytogenes* Pathogenesis: The Role of Stress Adaptation. *Microorganisms*, 1-26.
- Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 1236-1243.

- Van den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews*, 219-251.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., . . . Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 584-640.
- Widdel, F. (2010). Theory and Measurement of Bacterial Growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie*, 1-11.
- Widemann, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G., & Jarvis, N. A. (2021). Detection and Potential Virulence of Viable but Non-Culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A Review. *Microorganisms*, 1-11.
- Zhu, Q., Gooneratne, R., & Hussain, M. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, 1-11.
- Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R., & Guldimann, C. (2019). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time. *International Journal of Food Microbiology*, 83-92.

Sitografia

- https://www.iss.it/malattie-a-trasmissione-alimentare/-/asset_publisher/bE-kyu2xLEXUY/content/listeriosi-perinatale (04/10/2022)
- <https://www.epicentro.iss.it/listeria/> (5/10/2022)
- https://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=6004 (11/10/2022)
- <https://ilfattoalimentare.it/wurstel-mangiati-crudi-6-morti-allerta-supermercati-wudy-aia.html> (11/10/2022)
- <https://www.atcc.org/products/19111> (29/10/2022)