



FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE
BRESCIA

I MICRORGANISMI, I VEGETALI E L'UOMO

Maurizio Zavanella

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECHNICHE - BRESCIA

96

I MICRORGANISMI,
I VEGETALI E L'UOMO

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

- | | | | |
|-----------|--|-----------|---|
| 1 - 1979 | Infezioni respiratorie del bovino | 24 - 1989 | Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili |
| 2 - 1980 | L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria | 25 - 1990 | Mappaggio del genoma bovino |
| 3 - 1980 | Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria | 26 - 1990 | Riproduzione nella specie suina |
| 4 - 1980 | Gli antibiotici nella pratica veterinaria | 27 - 1990 | La nube di Chernobyl sul territorio bresciano |
| 5 - 1981 | La leucosi bovina enzootica | 28 - 1991 | Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi |
| 6 - 1981 | La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia | 29 - 1991 | La sindrome chetotica nel bovino |
| 7 - 1982 | Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale | 30 - 1991 | Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti |
| 8 - 1982 | Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino | 31 - 1991 | Allevamento delle piccole specie |
| 9 - 1983 | Zoonosi ed animali da compagnia | 32 - 1992 | Gestione e protezione del patrimonio faunistico |
| 10 - 1983 | Le infezioni da Escherichia coli degli animali | 33 - 1992 | Allevamento e malattie del visone |
| 11 - 1983 | Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria | 34 - 1993 | Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino |
| 12 - 1984 | 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale | 35 - 1993 | Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale |
| 13 - 1984 | Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo | 36 - 1993 | Argomenti di patologia veterinaria |
| 14 - 1984 | 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione | 37 - 1994 | Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche |
| 15 - 1985 | La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino | 38 - 1995 | Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento |
| 16 - 1986 | Immunologia comparata della malattia neoplastica | 39 - 1995 | Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica |
| 17 - 1986 | 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale | 40 - 1996 | Principi e metodi di tossicologia in vitro |
| 18 - 1987 | Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive | 41 - 1996 | Diagnostica istologica dei tumori degli animali |
| 19 - 1987 | Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecomatologia e marketing | 42 - 1998 | Umanesimo ed animalismo |
| 20 - 1988 | Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986 | 43 - 1998 | Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio |
| 21 - 1989 | Le infezioni erpetiche del bovino e del suino | 44 - 1998 | Lezioni di citologia diagnostica veterinaria |
| 22 - 1989 | Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie | 45 - 2000 | Metodi di analisi microbiologica degli alimenti |
| 23 - 1989 | La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa | 46 - 2000 | Animali, terapia dell'anima |
| | | 47 - 2001 | Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2000 |

- | | | | |
|-----------|--|-----------|---|
| 48 - 2001 | Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria | 71 - 2008 | V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria |
| 49 - 2001 | Tipizzare le salmonelle | 72 - 2008 | Proceedings of the 9 th world rabbit congress |
| 50 - 2002 | Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria | 73 - 2008 | Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria |
| 51 - 2002 | La valutazione del benessere nella specie bovina | 74 - 2009 | La biosicurezza in veterinaria |
| 52 - 2003 | La ipofertilità della bovina da latte | 75 - 2009 | Atlante di patologia suina I |
| 53 - 2003 | Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento | 76 - 2009 | Escherichia Coli |
| 54 - 2003 | Proceedings of the 37 th international congress of the ISAE | 77 - 2010 | Attività di mediazione con l'asino |
| 55 - 2004 | Riproduzione e benessere in conigliocultura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo | 78 - 2010 | Allevamento animale e riflessi ambientali |
| 56 - 2004 | Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina | 79 - 2010 | Atlante di patologia suina II
PRIMA PARTE |
| 57 - 2004 | Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento | 80 - 2010 | Atlante di patologia suina II
SECONDA PARTE |
| 58 - 2005 | Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli | 81 - 2011 | Esercitazioni di microbiologia |
| 59 - 2005 | IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria | 82 - 2011 | Latte di asina |
| 60 - 2005 | Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento | 83 - 2011 | Animali d'affezione |
| 61 - 2006 | Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito | 84 - 2011 | La salvaguardia della biodiversità zootecnica |
| 62 - 2006 | 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955-2005 | 85 - 2011 | Atti I Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria |
| 63 - 2006 | Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio | 86 - 2011 | Atti II Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria |
| 64 - 2006 | Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento | 87 - 2011 | Atlante di patologia suina III |
| 65 - 2006 | Proceedings of the 2 nd International Equitation Science Symposium | 88 - 2012 | Atti delle Giornate di Conigliocultura ASIC 2011 |
| 66 - 2007 | Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione | 89 - 2012 | Micobatteri atipici |
| 67 - 2007 | Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo | 90 - 2012 | Esperienze di monitoraggio sanitario della fauna selvatica in Provincia di Brescia |
| 68 - 2007 | Proceedings of the 6 th International Veterinary Behaviour Meeting | 91 - 2012 | Atlante di patologia della fauna selvatica italiana |
| 69 - 2007 | Atti del XXX corso in patologia suina | 92 - 2013 | Thermography: current status and advances in livestock animals and in veterinary medicine |
| 70 - 2007 | Microbi e alimenti | 93 - 2013 | Medicina veterinaria (illustrato). Una lunga storia. Idee, personaggi, eventi |
| | | 94 - 2014 | La medicina veterinaria unitaria (1861-2011) |
| | | 95 - 2014 | Alimenti di origine animale e salute |

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA -

Direttore scientifico: Prof. E. LODETTI

I MICRORGANISMI, I VEGETALI E L'UOMO

MAURIZIO ZAVANELLA

Collaboratori:

PATRIZIO GIULINI
GIULIO BERTOLONI
ANTONIO MAZZUCCHI
CARLO CANTONI
RENZO MIONI
BARBARA RIPAMONTI
MARIA ADA MARZANO
CLAUDIA MARIA BALZARETTI
PAOLA MASSI
GIOVANNI TOSI
SILVANO RODATO
ANNA MARIA FERRINI
BRUNELLA APPICCIAFUOCO
ELISABETTA DELIBATO
MICHELE SONNESSA

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia
www.fondiz.it

ISBN 978-88-97562-10-8

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, marzo 2014

Tipografia Camuna - Brescia 2014

NOTE BIOGRAFICHE DEGLI AUTORI

MAURIZIO ZAVANELLA Laureato in Scienze Biologiche a Padova nel 1965, ha lavorato dal 1966 al 1998 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna di Brescia, dove ha diretto il Dipartimento di Batteriologia, comprendente il Reparto di Microbiologia degli Alimenti.

PATRIZIO GIULINI Laureato in Scienze Biologiche nel 1964, professore ordinario di Botanica sistematica nella Facoltà di Scienze Naturali dell'Università di Padova. Ha tenuto numerosi corsi di specializzazione, tra cui Fitogeografia ed Ecologia Vegetale, Geobotanica, Economia rurale, Ingegneria del territorio, Parchi e Giardini, Botanica forestale in varie Università italiane ed estere.

Coordinatore dell'Orto Botanico di Padova, fa parte del Comitato Nazionale per i Giardini Storici, nei quali continua a spendere una lunga attività di consulenza presso la Sovrintendenza ai Beni Culturali, legando il suo nome al restauro dei parchi reali di Caserta, Racconigi e Venaria, nonché di alcune fra le più belle Ville Venete.

GIULIO BERTOLONI Professore del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche dell'Università di Padova.

ANTONIO MAZZUCCHI Laureato quinquennale in Scienze Agrarie – indirizzo Produzione Vegetale - presso la Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna, con tesi di laurea in Fitoiatria. Borsista del Consorzio *Spinner 2013*, ha partecipato alla messa a punto di un metodo di terapia fagica per la lotta al “colpo di fuoco” batterico, divenendo coinventore del brevetto depositato.

Dipendente a tempo indeterminato della Società Consulenze Fitopatologiche V.P.S. s.r.l. di Castel San Pietro Terme (Bologna), partecipa ad attività sperimentali di laboratorio e di campo e ad interventi di conservazione e restauro di alberi monumentali di un parco storico. È autore di articoli divulgativi inerenti la Fitopatologia.

CARLO CANTONI Libero Docente in Ispezione delle derrate alimentari di origine animale presso l'Università degli Studi di Milano.

RENZO MIONI Laureato in Scienze Biologiche all'Università di Padova nel 1976, dirige la Struttura Complessa di Microbiologia Alimentare presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Legnaro (Padova).

BARBARA RIPAMONTI Laureata in Scienze Biologiche a Milano e specializzata in Scienze e Tecnologie Cosmetiche, collabora con il Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, dove nel 2009 ha conseguito il Dottorato. Vanta oltre 50 pubblicazioni scientifiche.

MARIA ADA MARZANO Laureata in Veterinaria a Milano, Dottore di Ricerca in Alimentazione Animale e Sicurezza Alimentare, lavora presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano. È Autrice di 38 pubblicazioni scientifiche.

CLAUDIA MARIA BALZARETTI Laureata in Medicina Veterinaria a Milano, lavora come ricercatore nel Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare della Facoltà di Medicina Veterinaria, dove si occupa di igiene, qualità e sicurezza degli alimenti nella ristorazione collettiva. È docente nei corsi di laurea di Medicina Veterinaria e Tecniche della Prevenzione nell'ambiente e nei luoghi di lavoro, con 156 pubblicazioni scientifiche.

PAOLA MASSI Dirige la Sezione di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Ha all'attivo 26 anni di servizio nell'Ente Pubblico e 4 anni di libera professione veterinaria. Conta 133 pubblicazioni, la maggior parte concernenti argomenti di patologia aviare.

GIOVANNI TOSI Laureato in Medicina Veterinaria a Parma, specializzato in "Sanità animale, igiene dell'allevamento e delle produzioni animali" a Pisa, lavora presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, in cui si occupa prevalentemente di patologia aviare. Ha 96 pubblicazioni.

SILVANO RODATO Dal 1980 è docente in servizio di Scienza dell'alimentazione presso l'Istituto Alberghiero IPSSAR "G. Maffioli" di Castelfranco Veneto (TV).

È autore di libri di testo per la scuola secondaria, per la scienza degli alimenti e la chimica, editi dalla Clitt-Zanichelli. Dal 1999 al 2010 è stato Supervisore di tirocinio presso la SSIS del Veneto (Università Cà Foscari) ed è stato docente del Laboratorio di Didattica della Chimica e della Chimica Industriale presso la SSIS Veneto, sotto la guida del Prof. Gianni Michelon.

ANNAMARIA FERRINI Laureata in Scienze Biologiche nel 1976, diplomata in Scienza dell'Alimentazione nel 1980 e di Specializzata in Scienza dell'Alimentazione nel 1987. Lavora dal 1981 presso l'Istituto Superiore di Sanità di Roma. È Primo Ricercatore del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare e dal 2011 responsabile del Laboratorio Nazionale di Riferimento del latte e dei prodotti a base di latte. Si occupa principalmente di microbiologia degli alimenti e della presenza di residui di inibenti nei prodotti di origine animale con metodi di *screening*.

BRUNELLA APPICCIAFUOCO Laureata in Biologia Sanitaria presso l'Università degli Studi dell'Aquila. Opera nell'ambito della sicurezza alimentare presso l'Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare – con attività di ricerca inerenti la microbiologia degli alimenti e lo *screening* dei residui di inibenti in prodotti di origine animale.

ELISABETTA DELIBATO Laurea in Scienze Biologiche presso l'Università "La Sapienza" e Dottorato di Ricerca in Scienze Chimiche presso l'Università di "Tor Vergata" di Roma. Opera nell'ambito della sicurezza alimentare presso l'Istituto Superiore di Sanità, con attività di controllo e ricerca inerenti la microbiologia degli alimenti. Da diversi anni si occupa dello sviluppo di metodi molecolari per la ricerca di microrganismi patogeni in alimenti di origine animale e vegetale.

MICHELE SONNESSA Laurea in Biotecnologie Biomediche nel 2009 presso l'Università degli studi della Basilicata. Opera nell'ambito della sicurezza alimentare presso l'Istituto Superiore di Sanità. Si occupa dello sviluppo di metodi alternativi, cPCR, qPCR e PFGE per la ricerca, sierotipizzazione e sub-tipizzazione della *Listeria monocytogenes* in alimenti di origine animale e campioni clinici.

PRESENTAZIONE

In un recentissimo libro Umberto Veronesi, parlando di salute, etica e ambiente, sottolinea i vantaggi della dieta vegetariana e, da oncologo, afferma che in Italia tre tumori su dieci sarebbero conseguenza di un'alimentazione errata.

Tuttavia gli esperti microbiologi e nutrizionisti ci dicono che per trarre vantaggio in sicurezza da una dieta ricca di frutta e verdura ed evitare qualche rischio di malattia da contaminanti legati alle piante (anch'esse si ammalano a causa dei batteri e dei virus ospiti!) vanno rispettate alcune regole.

Quindi conoscere meglio i rapporti fra i microrganismi e l'“universo verde” costituisce lo scopo di questo “quaderno”, dedicato a tutti coloro che, per motivi di lavoro, amano i vegetali e si occupano del loro benessere e della loro salute, come di quella dell'uomo o degli animali.

Il Segretario Generale
dr. Stefano Capretti

INDICE

Parte Prima

CAPITOLO 1 - *I MICRORGANISMI NORMALMENTE PRESENTI SULLE PIANTE*.....3

Sui vegetali (e dentro i vegetali) convivono, come succede negli altri esseri viventi, parecchi microrganismi quasi sempre invisibili, cioè batteri, funghi e virus.

Il più delle volte questi ospiti non provocano danni alla pianta, che pertanto non mostra segni sospetti tali da renderla indesiderabile quale alimento all'uomo o agli animali.

CAPITOLO 2 - *I MICROBI PATOGENI PER LE PIANTE*..... 19

Alcuni microrganismi in certe situazioni sono capaci di indurre malattie nella pianta. Il più delle volte questo accade quando vengono meno le difese immunitarie naturali del vegetale in conseguenza di cambiamenti fisici o chimici dell'ambiente.

CAPITOLO 3 - *I GERMI PERICOLOSI TRASMESSI DAI VEGETALI ALL'ESSERE UMANO E AGLI ANIMALI CON L'ALIMENTAZIONE*..... 47

Molti ritengono, a torto, che i vegetali edibili non abbiano mai in sé sostanze pericolose, fatta eccezione dei funghi velenosi. Di conseguenza sono convinti che non si corrano rischi dando la preferenza nell'alimentazione ai cibi vegetali.

Dimenticano però che i prodotti della terra possono essere contaminati da microrganismi patogeni per l'uomo (ed anche per gli animali). Proprio i vegetali, consumati crudi e mal lavati, possono diventare importanti vettori involontari d'infezione e quindi causa di malattie di origine alimentare.

CAPITOLO 4 - *STATISTICHE SULLA FREQUENZA DEI GERMI PATOGENI IN ALIMENTI VEGETALI*..... 71

Negli USA, dopo vent'anni di ricerche, i dati mostrano una situazione inattesa. Già nel 1986, la *Food and Drug Administration* (FDA), ricercando *Listeria monocytogenes* nei formaggi molli e nei derivati del latte, aveva invitato i microbiologi a tenere d'occhio anche i vegetali crudi, sapendo che questo microbo pericoloso si trova nelle feci di almeno 40 specie animali e che i fertilizzanti a base di sottoprodotti animali costituiscono una possibile fonte d'inquinamento delle coltivazioni.

Nel 2011 un documento emesso dall'organismo statale di sorveglianza sulle malattie infettive (*Communicable Diseases Center*) ribadiva quanto sopra.

Dai controlli di laboratorio sui prodotti vegetali di largo consumo (in particolare, quelli della IV gamma fatti in Italia), anche nelle nostre zone la situazione igienica mostrerebbe analogie con gli USA.

CAPITOLO 5 - COSA RACCOMANDANO GLI ESPERTI DI ALIMENTAZIONE 73

Grazie all'evoluzione delle linee-guida alimentari, si è arrivati a riconoscere un ruolo centrale della frutta e della verdura nella salute umana. L'importanza dei prodotti ortofrutticoli nella regolazione di parecchi meccanismi fisiologici è ormai assodata. Nella preparazione e nel consumo di questi prodotti vanno solo rispettate alcune avvertenze che ne esaltano le qualità dietetiche in tutta sicurezza.

CAPITOLO 6 - VEGETALI E MUFFE: IL PROBLEMA DELLE MICOTOSSINE E MICOTOSSICOSI IN VETERINARIA..... 93

Tra i metaboliti prodotti da alcuni funghi (o muffe) ne esistono di tossici (le micotossine) dotate di effetti talora molto gravi. Le patologie umane ed animali causate dall'ingestione di alimenti contenenti micotossine sono chiamate micotossicosi. Il problema micotossine coinvolge tutta la filiera agronomica e zootecnica e, per questo motivo, si può verificare sia in campo che durante la fase di stoccaggio delle materie prime e dei mangimi finiti.

CAPITOLO 7 - IL RUOLO DEI MICRORGANISMI IN ALCUNE PRODUZIONI DI ORIGINE VEGETALE... 115

L'uomo, ricorrendo alle fermentazioni, ha imparato a trasformare alcuni prodotti vegetali in alimenti di largo consumo. Un'arte davvero antichissima, che ha ribaltato la convinzione secondo cui i germi sarebbero sempre e solo nocivi.
Inoltre, in tempi più recenti, si è cominciato ad utilizzare alcune specie di batteri o di lieviti per contrastare in agricoltura altri esseri indesiderati, cioè a fare la cosiddetta "lotta biologica", un campo molto interessante ancora da esplorare.

Parte Seconda

CAPITOLO 8 - METODI D'ANALISI PER LA RICERCA IN LABORATORIO DI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLE DETERMINAZIONI PIÙ RICHIESTE PER I PRODOTTI VEGETALI 146

Procedure raccomandate

Appendice

TABELLE..... 185

PARTE PRIMA

Capitolo 1 I MICRORGANISMI NORMALMENTE PRESENTI SULLE PIANTE

PATRIZIO GIULINI¹, GIULIO BERTOLONI¹, MAURIZIO ZAVANELLA²

¹ Università di Padova - patricius.dom@alice.it - giulio.bertoloni@gmail.com

² Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia - maurizio.zavanella@libero.it

LE SIMBIOSI PIANTE-BATTERI

La rizosfera

Già agli inizi del '900 gli studiosi (tra cui Hiltner) si erano accorti che nel suolo i microrganismi sono più abbondanti in prossimità delle radici delle piante che non nel terriccio libero e hanno cominciato a chiamare "rizosfera" la porzione del suolo che è influenzata dalle radici stesse.

L'estensione effettiva della rizosfera è stata poi argomento di numerose diatribe fra gli specialisti, per il fatto che il distacco del terriccio dalle radici poteva essere effettuato con differenti metodi di lavaggio. Ciò ovviamente portava alla stima di quantità diverse di batteri, funghi raccolti e di biomassa vegetale calcolata.

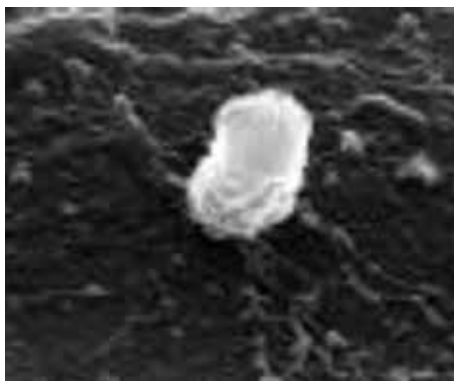
Con il progresso delle tecniche di istologia microscopica sono stati messi a punto metodi di colorazione del tessuto radicale in grado di far vedere le colonie batteriche adese (per esempio, trattamento con blu anilina + acido fenol-acetico nella colorazione di Stille).

Ancora, con la tecnica di Fahraeus, che consiste nell'esame diretto al microscopio di neoradici sviluppate, è stato possibile vedere come procede la colonizzazione da *Rhizobium* sulle radici di pomodori, leguminose ed altre piante.

Con l'avvento della microscopia elettronica si è visto che attorno alle radici delle piante esiste uno strato mucillaginoso dello spessore di alcuni *micron* e che a ridosso di questo si forma un *biofilm* molto esteso e coprente di batteri (per lo più corti bastoncini), spesso circa 30 *micron* (foto). Le ife dei funghi preferiscono invece svilupparsi intorno alla corona della radice, lasciando libero l'apice di accrescimento.

Le radici sembrano convivere soprattutto con batteri che assorbono facilmente le sostanze nutritive rilasciate dalla pianta, per cui si raggiungono molto spesso cariche altissime di germi, ad esempio dell'ordine di 4×10^{12} /grammo di rizosfera.

Secondo alcuni Autori, fra i batteri sulle radici sarebbero predominanti *Pseudomonas* (Gram-) e *Arthrobacter* (Gram+, che decolora facilmente), un bacillo che forma spesso ramificazioni.



Muffe: *Aspergillus niger*



Radici infestate da Rhizobium spp

Osservazioni più recenti hanno spostato le prevalenze su altri due generi, ***Rhizobium***, formato da numerose specie (distinte da nomi che ricordano la pianta ospite, per esempio, *leguminosarum*) e *Azotobacter*, che colonizza le radici solo dopo ripetuti passaggi di adattamento.

Tra i funghi, i più diffusi appartengono all'ordine *Mucorales* e al genere *Fusarium*.

La fillosfera

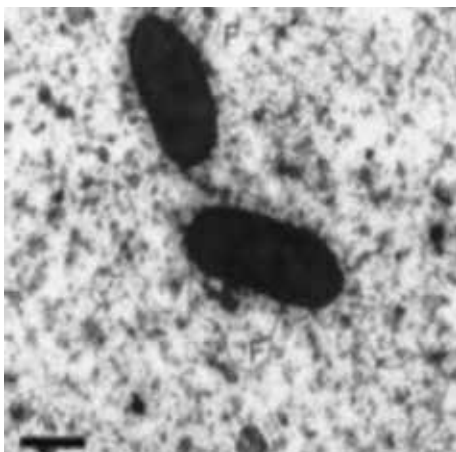
Le piante sane – al pari degli altri organismi viventi – sono colonizzate da batteri, lieviti, funghi filamentosi e alghe, che prendono genericamente il nome di *epifiti*.

I batteri sono numericamente prevalenti rispetto agli altri microrganismi e si trovano soprattutto sulle parti del vegetale esposte all'aria, in ordine decrescente di frequenza su foglie, fiori e frutti, che assieme formano la cosiddetta *fillosfera*.

Le foglie (e non le radici, come si credeva) rappresentano quindi l'*habitat* principale, dove i batteri raggiungono cariche anche molto elevate, pari a 10^7 cellule/cm², risultando, tra l'altro, ben visibili al microscopio con opportune tecniche d'osservazione.

A differenza dei funghi, ospiti temporanei presenti per lo più come spore, i batteri sono capaci di resistere sulle foglie per tutta la vita della pianta, variando eventualmente quanto a specie e a numero secondo le stagioni e lo stato vegetativo della pianta.

Qualche specie cresce di preferenza sulle foglie giovani e può presentarsi ciclicamente per più anni nella stessa stagione sulla medesima pianta, come si è visto con *Pseudomonas fluorescens*.



Azospirillum

Su una pianta si trovano spesso contemporaneamente più specie batteriche, che differiscono addirittura da soggetto a soggetto cresciuto nello stesso *habitat*.

Inoltre i germi delle foglie sono diversi da quelli esclusivi delle radici, per esempio *Rhizobium* e *Azospirillum*.

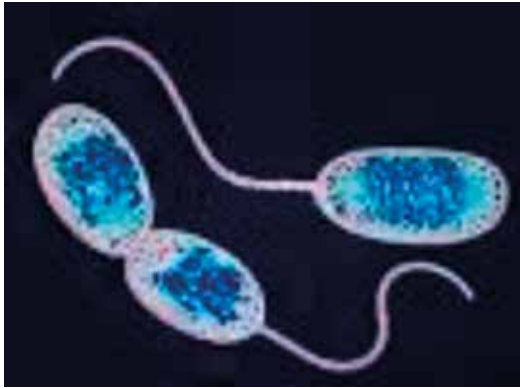
Fino a tempi recenti, quanto a ospiti delle foglie, si conoscevano principalmente specie batteriche Gram-negative, tra cui *Pseudomonas syringae* ed *Erwinia* spp. (o *Pantoea*), molto rappresentative degli epifiti sulla fillosfera.

Oggi, grazie a tecniche non basate esclusivamente sull'isolamento in coltura, si possono riconoscere parecchie specie microbiche non studiate prima, ad esempio comparando le sequenze del gene 16S rRNA con metodi non convenzionali (sonde geniche).

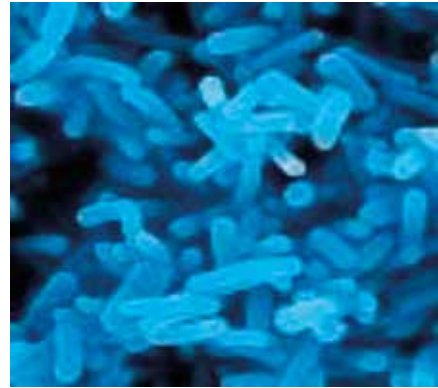
SORGENTE E DISSEMINAZIONE DEI BATTERI SIMBIONTI

I batteri concorrono a determinare processi chimici di trasformazione delle sostanze diffuse nel suolo o nelle acque circostanti, tra cui si ricordano:

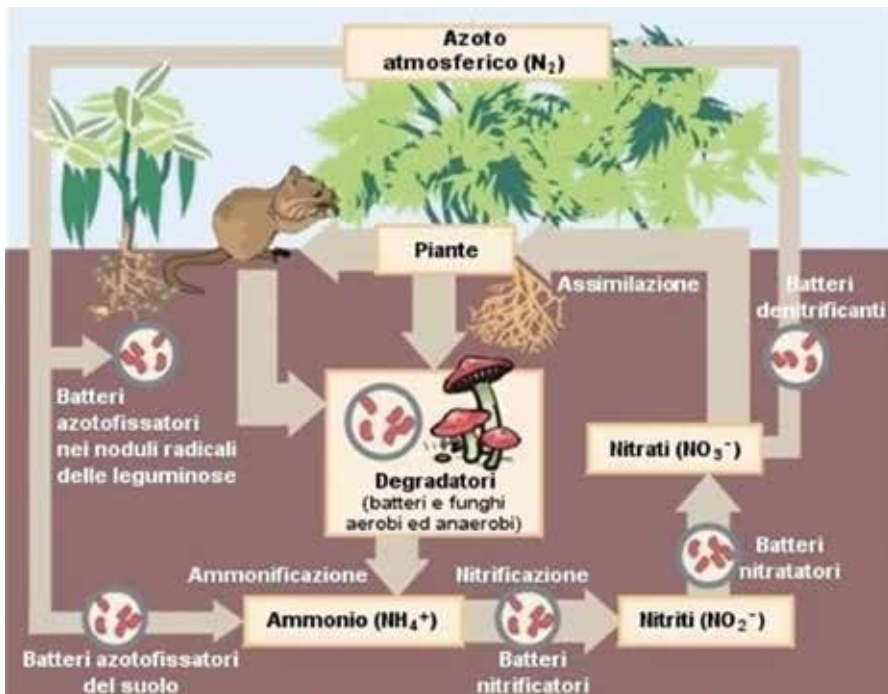
- azotofissazione, che permette a specie anaerobie (*Clostridium*) o aerobie (*Rhizobium*, *Azotobacter*) di assumere l'azoto dal terreno o dall'aria;
- nitrificazione, che consiste nella trasformazione dell'ammoniaca e di ioni ammonio, derivati dalla putrefazione dei resti di animali e vegetali, in nitrati e nitriti, cioè sali inorganici solubili che le piante possono assorbire con le radici, utilizzandoli per la crescita (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*);
- denitrificazione, con la quale i batteri che vivono soprattutto in ambienti umidi traggono l'azoto direttamente dai nitrati, liberandolo come gas nell'atmosfera (*Pseudomonadaceae* e altri);
- solubilizzazione dei fosfati.



Nitrobacter



Nitrosomonas



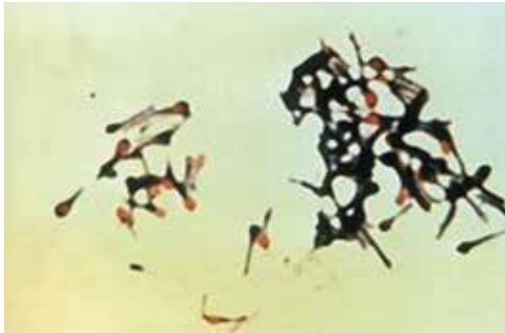
Lo sviluppo dei batteri sulle radici delle piante è sempre condizionato da una serie di fattori. Il più importante è la secrezione di essudati che le radici emettono e che i batteri gradiscono. Seguono poi il pH del terreno (non deve essere troppo acido), la quantità di acqua disponibile (si pensi alle piante del deserto), l'età della pianta.

Il numero dei microrganismi cresce inoltre con l'età del vegetale e la temperatura ambiente. Quest'ultima sembra influenzare cambiamenti drastici nella composizione della flora batterica. Difatti, se la temperatura è congeniale allo sviluppo della pianta, prevalgono sulle radici i germi Gram-negativi, mentre in condizioni anomale si ha il sorpasso da parte dei Gram-positivi.

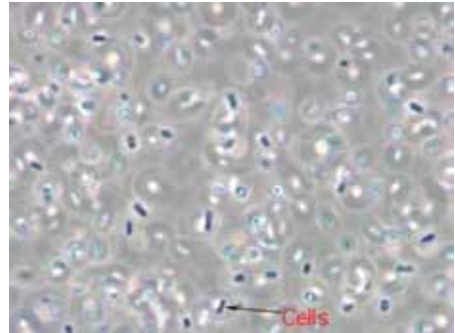
Anche l'aggiunta di sostanze chimiche modifica l'equilibrio tra pianta e batteri. Infatti con l'uso dei fertilizzanti (in particolare: i superfosfati) c'è un incremento notevole nel numero complessivo dei batteri, oltre allo sviluppo precoce del vegetale, entrambi assetati di fosforo da organicare.

Invece, con l'introduzione degli antibiotici in agricoltura si vedono altri fenomeni. Per esempio, la streptomicina inverte le proporzioni fra Gram-negativi e Gram-positivi, mentre il cloramfenicolo riduce i batteri, ma lascia spazio alla moltiplicazione dei funghi.

D'altra parte, i batteri possono modificare la forma delle radici oppure il rapporto ponderale normale fra fusto e radici o, ancora, agire sulla fioritura, attraverso processi che interferiscono con la richiesta della pianta di sali minerali (come calcio, fosforo, zolfo) e di oligoelementi.



Clostridium spp



Azotobacter spp

LA REITERAZIONE DELLE SIMBIOSI

Penetrazione nell'ospite

Si è visto che i batteri sanno adattarsi molto bene all'ambiente fogliare, un tempo ritenuto ostile perché eccessivamente umido. In realtà l'umidità emessa attraverso gli stomi sulla foglia può essere o sequestrata dai germi o evitata con una migrazione dei germi nel tessuto profondo.

Anche il pericolo dell'esposizione ai raggi ultravioletti (UV) viene minimizzato dai batteri, come dimostrato da *Pseudomonas syringae*. Questo germe, attraverso plasmidi indotti, fabbrica DNA mutageno (*repair*). In pratica, uno stratagemma per tollerare l'effetto battericida degli UV.

Colonizzazione dell'ospite

Certamente il fattore determinante per la colonizzazione di una pianta è la disponibilità di sostanze nutritive, che per i batteri significa in primo luogo il carbonio (presente negli zuccheri glucosio, fruttosio, saccarosio) e poi l'azoto.

Poiché le sostanze nutritive non sono distribuite uniformemente sulle superfici dei vegetali, i batteri vanno a cercarle nei luoghi di maggior concentrazione, per esempio a livello dei trichiomi ghiandolari e delle lesioni. Qui si formano degli aggregati di batteri anche molto grossi, ben visibili al microscopio.

I batteri mettono in campo anche altri meccanismi per procurarsi le sostanze nutritive, generalmente scarse e raggiungibili con fatica a causa della loro modesta mobilità sulle superfici idrofobe delle foglie.

Pertanto i batteri provvedono, se del caso, ad aumentare l'umidificazione delle foglie, emettendo sostanze biosurfattanti, che creano **biofilm** (foto). Vengono quindi facilitate le capacità di movimento (come avviene per il 50% dei ceppi di *Pseudomonas* spp.), il che permette di raggiungere le sedi più ricche di nutrimento.

La caccia al nutrimento induce i batteri a riunirsi in aggregati. Ciò diventa possibile con l'emissione di polisaccaridi (EPS), che proteggono i germi da alcuni stress, quali essiccamento, presenza d'ossigeno e di perossido d'idrogeno (H_2O_2).

Tipica, in questo senso, è la sintesi dell'alginato prodotto da *Pseudomonas syringae* nell'*habitat* circostante.

Non sempre succede che i batteri cerchino il loro nutrimento senza danneggiare la pianta che li ospita.

A volte le sostanze biosurfattanti sono vere e proprie tossine, come la toolasina elaborata da *Pseudomonas toolasi* o la siringomicina, formata da *Pseudomonas syringae*.

Quest'ultimo germe apre dei canali ionici nella membrana citoplasmatica delle cellule vegetali, attraverso i quali "succhia" le sostanze nutritive e può portare a morte la pianta per lisi cellulare.

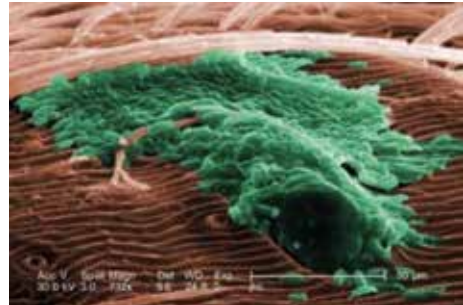
Inoltre la sintesi dell'alginato può avere cattive conseguenze, in quanto innalza il punto di congelamento dell'acqua, favorendo la formazione di ghiaccio.

Pseudomonas syringae e altri germi, compresi nella categoria chiamata degli ICE⁺, hanno la caratteristica della nucleazione del ghiaccio sulle foglie, che vanno incontro quindi a gravi danni da congelamento.

Altri batteri (tra cui *Pantoea agglomerans*) per catturare gli zuccheri mimano una delle attività del vegetale su cui si trovano, sintetizzando cioè l'acido β -indol-3-acetico (IAA), che è un promotore della crescita (ad esempio, dei fiori del pero o dei piselli).

Questa sostanza, purtroppo, a concentrazioni eccessive ha effetti auxinici sulla pianta, che va incontro a dannosi processi di iperplasia.

Oltre ai fenomeni citati, abbastanza diffusi per le specie batteriche saprofite (ma anche per quelle patogene), si sa che *Pseudomonas syrin-*



biofilm batterico



Pantoea agglomerans



Pseudomonas syringae

gae (un patogeno vegetale assai temuto) emette particolari molecole (secrezione funzionale di tipo III), che condizionano il vegetale a modificare il suo metabolismo in favore del germe.

Si direbbe che i batteri normalmente presenti sulle piante cerchino solo la loro sopravvivenza, a scapito della pianta che li ospita.

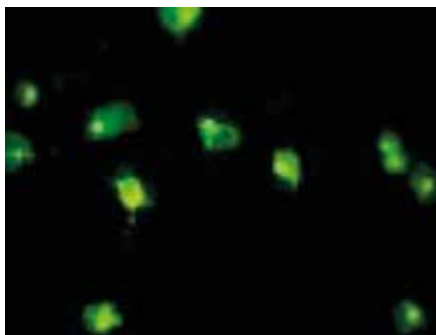
Questo non è sempre vero, perché certe specie microbiche, per lo più non-patogene, ampiamente diffuse nella fillosfera, svolgono un'azione antagonista e/o competitiva verso altri batteri indesiderati. Per esempio, *Pseudomonas fluorescens* e *Pantoea agglomerans* agiscono contro *Erwinia amylovora*, responsabile della "Fire blight disease", una malattia devastante le coltivazioni di mele e pere.

Un imponente scambio di plasmidi avviene proprio nei siti di agglomerazione dei batteri sulle foglie, per cui in futuro questi fenomeni potrebbero essere sfruttati per "piegare" i saprofiti vegetali (in maggioranza innocui) verso scopi di grande utilità.

Per esempio, nella lotta contro malattie di piante a uso alimentare e ornamentale che oggi richiedono trattamenti antibiotici (streptomicina e ossitetraciclina).

Oppure per produrre sostanze che servono all'uomo, come in qualche caso già avviene:

- biodegradanti (contro l'atrazina da *Agrobacterium radiobacter* ceppo J14; contro il colesterolo da *Agrobacterium* ceppo M4);
- stimolanti (tipo arpina da *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*);
- tecnologiche (tipo lo xantan da *Xanthomonas campestris* e gli enzimi di restrizione per il DNA).



Da sinistra verso destra:
Agrobacterium spp., *Xanthomonas campestris*,
Erwinia amylovora, *Pseudomonas fluorescens*

L' IMPATTO SOCIO-ECONOMICO

Agricoltura e alimentazione

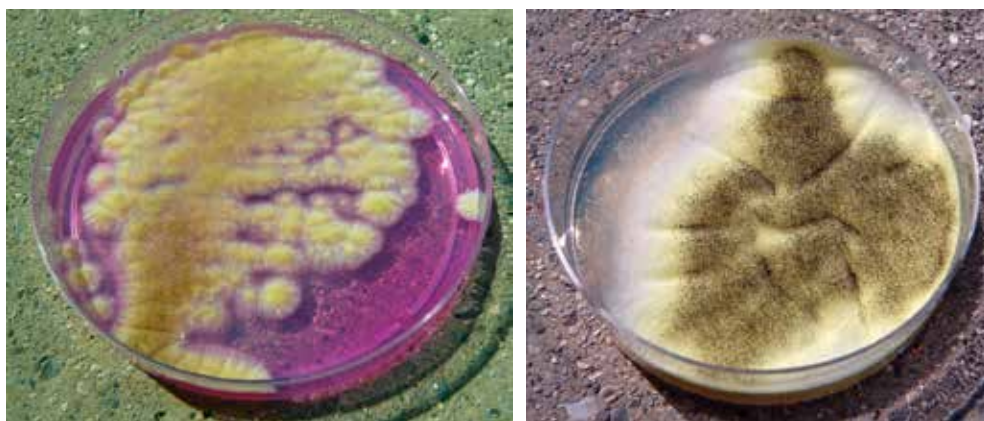


Per gentile concessione di Ortofrutta “La Primizia” di Fontana Roberto e C. (S.n.c.) a Sirmione (BS).

Da qualche anno in occidente il consumo dei vegetali è in continuo aumento. Questo orientamento nell'alimentazione è collegabile a due motivi: i consigli dei dietologi che raccomandano di mangiare almeno per cinque giorni alla settimana frutta fresca e vegetali; la necessità per molti di fare il pasto di mezzogiorno fuori casa, scegliendo spesso nei bar insalate pronte e frutta pre-tagliata.

Ma come si presentano questi cibi freschi dal punto di vista della carica microbica?

Tournas *e Coll.* (2005) si sono dedicati nello stato di Washington D.C. (USA) allo studio dei lieviti sulle verdure fresche, col risultato di trovarne livelli fino a 4×10^8 per grammo, mentre per le muffe il conteggio si fermava a valori intorno a 10^4 /g.



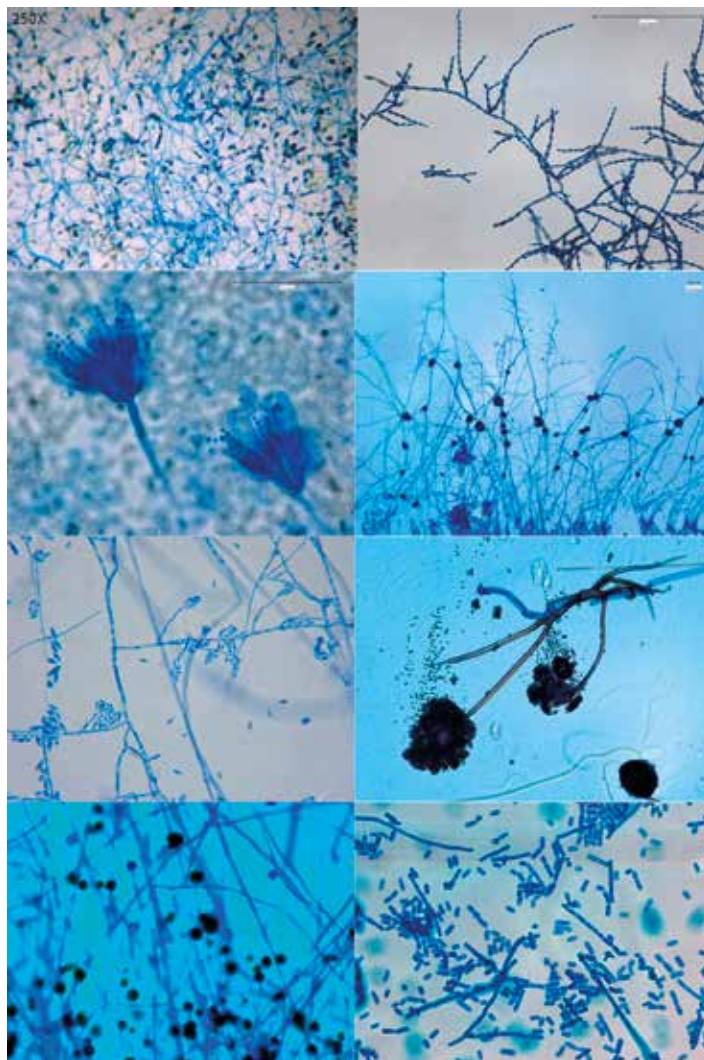
Colonie di muffe isolate e sviluppate su terreno sintetico in laboratorio: Aspergillus niger

La parte più interessante delle loro ricerche riguarda però i **germogli** di varia origine (piselli, erba medica, broccoli, aglio, cipolla, spezie, chiodi di garofano, lenticchie).



Qui hanno trovato le più forti concentrazioni di muffe, cioè tra 10^5 e 10^8 per grammo (in ordine decrescente delle seguenti specie: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*).

I miceti (muffe e lieviti) sono infatti un altro aspetto complementare della carica microbica dei vegetali, non privo d'importanza sanitaria, perché dalle muffe si possono produrre le micotossine.



Da sinistra verso destra:

Alternaria, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Geotrichum*

Abadias e Coll. (2008) hanno esaminato in Spagna quattro categorie di prodotti ortofrutticoli il più possibile vicino all'origine, in quanto appena preparati (verdura a foglia intera, verdura pre-tagliata, germogli, frutta tagliata a pezzetti).

Lo scopo principale della ricerca non era tanto di trovare germi patogeni (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*) che notoriamente si possono rinvenire sui vegetali, quanto di studiare la concentrazione dei germi che vivono normalmente sui prodotti pronti per essere commercializzati (mesofili, psicrofili, lattici, enterobatteri, miceti).

La verdura a foglia intera esaminata era quella venduta sfusa in cassette, mondata prima dell'esame delle bratte esterne, mentre i prodotti tagliati erano normali confezioni di frutta o **insalata già lavata, presentata refrigerata in buste o vaschette nei supermercati.**



I risultati dell'indagine sono riassunti nella seguente tabella:

- Situazione microbiologica di quattro categorie di prodotti ortofrutticoli freschi, esaminati il più possibile vicino all'origine.
- **Cariche batteriche espresse in numero di germi per grammo (ufc/g).**
- Comportamento prevalente in almeno il 50% dei 300 campioni esaminati.

CATEGORIA	< 10 ⁵	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ⁶ – 10 ⁷	10 ⁷ - 10 ⁸	RICERCA
Verdure a foglia intera (1)					Mesofili
					Psicrofili
					Lattici
					Enterobatteri
					Miceti
Insalate pre-tagliate (2)					Mesofili
					Psicrofili
					Lattici
					Enterobatteri
					Miceti
Germogli					Mesofili
					Psicrofili
					Lattici
					Enterobatteri
					Miceti
Frutta tagliata a pezzetti					Mesofili
					Psicrofili
					Lattici
					Enterobatteri
					Miceti

(1) Verdure a foglia intera: iceberg, lattuga, trocadero, romana, indivia.

(2) Insalate pre-tagliate: rucola, carote grattugiate, granoturco, indivia, lattuga, spinaci, insalata mista.

Come era prevedibile, la contaminazione dei prodotti pre-tagliati supera quella degli analoghi a foglia intera (quindi non lavorati). Ciò conferma il peso della manipolazione nel trasporto di germi dall'ambiente all'alimento. Peraltro, la rilevazione sensoriale di una contaminazione che renda il prodotto inaccettabile è difficile, poiché lo stato di alterazione si ha solo con cariche di oltre 10^7 - 10^8 germi per grammo.



In dettaglio, i conteggi batterici più elevati si sono visti su **germogli** (foto), carote grattugiate, rucola e spinaci (probabilmente più sporchi di terriccio), mentre i più bassi erano quelli di lattuga e indivia. Lo stesso discorso vale anche per i lattobacilli, che assieme alle *Pseudomonadaceae* sono sempre presenti sui vegetali.

Tra i batteri lattici primeggia *Leuconostoc mesenteroides*, responsabile della degradazione dei vegetali (con fenomeni visibili di essudazione, acidificazione, disgregazione del tessuto).

Si nota anche che la quantità di mesofili e di psicrofili procede di pari passo e che le *Enterobacteriaceae* sono relativamente poco inquinanti, anche se *Erwinia herbicola*, *Rahnella aquatilis*, *Enterobacter agglomerans* e *Serratia* spp. sono i generi più diffusi nei vegetali appena colti.

Zhang e Coll. (2010), analizzando i microrganismi normalmente presenti sui cinque tipi di verdure maggiormente utilizzate in cucina (spinaci, sedano, rapa, broccoli, cavolfiore) hanno rilevato la presenza di una gran varietà di specie batteriche, con predominio dei Gram-positivi.

OSSERVAZIONI PERSONALI

Nel 2012 sono stati prelevati a caso, in periodi diversi, 17 campioni di verdura e 3 di frutta fresca di stagione (vedi tabella), acquistati sfusi in differenti punti di vendita al dettaglio.

Unico criterio di scelta del prodotto da esaminare era l'aspetto sensoriale soddisfacente, che faceva presumere trattarsi di merce raccolta di recente e gradevole da consumare.

Ciascun prelievo è stato replicato su analogo materiale cambiando fornitore.

Su ogni prodotto, non lavato ma privato delle foglie esterne o della buccia (se presenti), è stata ricercata la carica batterica totale aerobia a $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con il metodo di Kramer (*Drop Plate*).

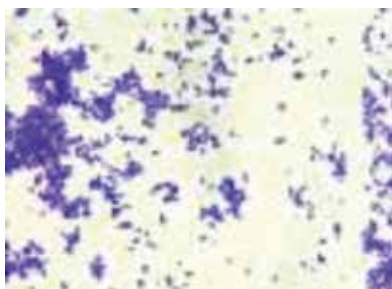
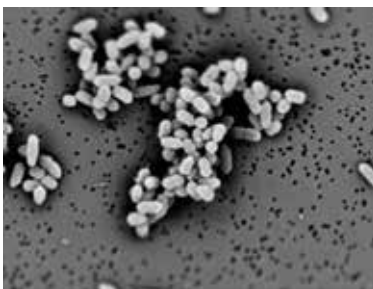
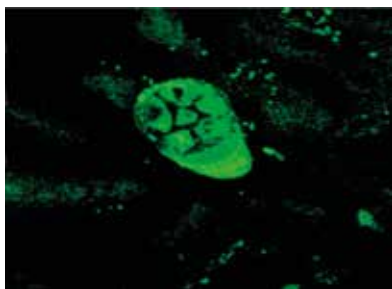
La sospensione del materiale (25 grammi +100 ml di soluzione sterile di Ringer $\frac{1}{4}$ concentrata), realizzata omogeneizzando per 2 minuti in sacchetto da Stomacher con filtro, serviva per allestire quattro diluizioni decimali (mcl 20 + mcl 180 dello stesso diluente), da seminare in doppio a 20 mcl su piastre di Plate Count Agar (Oxoid).

Dopo incubazione a $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 48 ore, il conteggio delle micro-colonie permetteva di calcolare il numero totale di batteri (u.f.c.) per grammo.

NOTA - I risultati riportati nella seguente tabella hanno evidentemente un valore del tutto indicativo, dato il numero ridotto dei campioni esaminati.

Carica batterica totale aerobia a +30°C in 20 tipi di prodotti vegetali

Tipo di verdura o frutta	Intervalli di conteggio del numero di batteri (u.f.c.) per grammo					
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
Insalata <i>iceberg</i>						
Insalata lattuga						
Pomodori						
Peperoni verdi						
Radicchio rosso						
Zucchine						
Carote						
Spinaci foglia intera						
Spinaci foglioline						
Cime di rapa						
Piselli fini						
Piselli finissimi						
Rucola						
Cicoria di campo						
Fagiolini						
Finocchio						
Cavolfiore						
Fragole						
Prugne						
Mandaranci						



Da sinistra verso destra:
Erwinia herbicola, *Rahnella aquatilis*, *Serratia* spp., *Enterobacter agglomerans*

Sanità pubblica

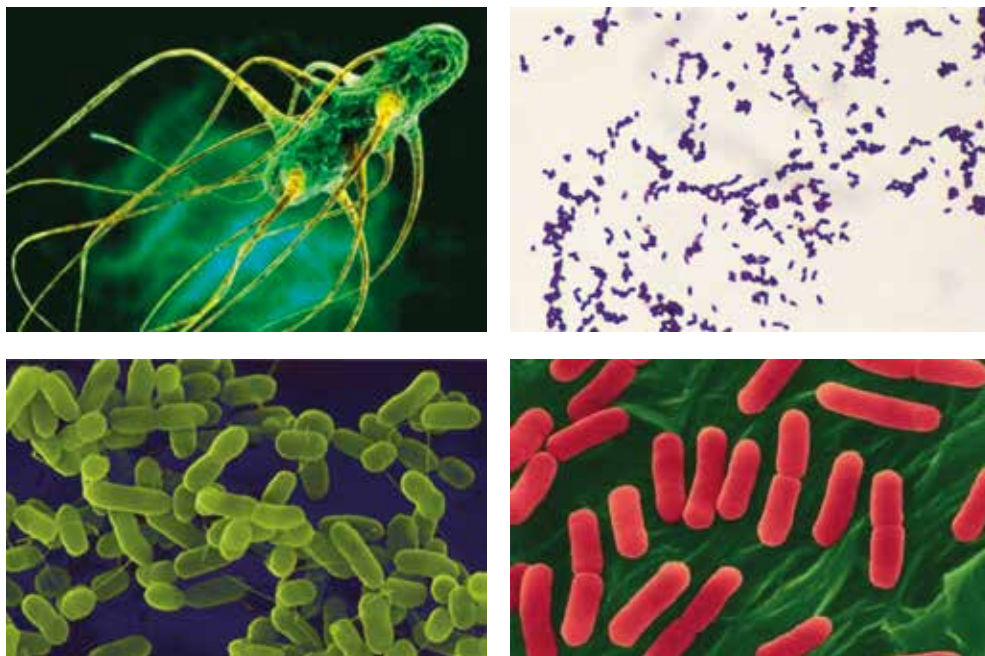
Se si guarda la statistica di Abadias *e Coll.* (2008) si può notare che tra i generi di batteri ricercati figurano le enterobatteriacee, tradizionalmente conteggiate quali indici d'igiene.

Bisogna puntualizzare che questi germi, nonostante il loro nome, non sono più un indice credibile di contaminazione fecale, perché si trovano ampiamente diffusi in natura, anche al di fuori dell'intestino degli animali.

Solo *Escherichia coli* è un indicatore affidabile e, difatti, è stato trovato in forte quantità nei germogli, che crescono in prossimità del terreno dove, presumibilmente, non mancano le concimazioni con lettiera animale non stagionata.

I miceti possono dare rare conseguenze spiacevoli solo nella frutta, dove sono in grado di produrre micotossine, anche se la frutta, tra i vari prodotti vegetali, è quello che si difende meglio, grazie ad un pH più acido e all'esocarpo (buccia).

Quanto ai patogeni, nella stessa ricerca di Abadias *e Coll.* sopra menzionata e presa per esempio, su 300 campioni esaminati *Salmonella* è stata isolata solo quattro volte (da granoturco, spinaci, lattuga e insalata mista); *Listeria monocytogenes* due volte (da lattuga e insalata mista). Non sono stati isolati ceppi di *E. coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter*.



Da sinistra verso destra:

Salmonella spp. , *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O 157:H7

La lavorazione anche minima dei prodotti vegetali raccolti dal campo (*minimally processed*, come li chiamano gli Autori americani) incide in maniera non trascurabile sulla carica batterica.

Di questo parere si trovano più Ricercatori, che hanno fatto dei confronti “prima-dopo”. Johnston *e Coll.* (2005), da un’analisi sulle condizioni igieniche dei vegetali condotta nel Nord Carolina (USA), hanno segnalato un forte incremento dei coliformi nel confezionamento del coriandolo e del prezzemolo. Ancora maggiore è l’apporto di germi sul melone in

seguito a taglio e confezionamento.

Difatti, in queste circostanze la carica batterica totale può aumentare di un logaritmo (da 10^6 a 10^7 log per grammo) e la quantità di coliformi e di enterococchi di due logaritmi (rispettivamente, da 10^2 a 10^4 e da 10^3 a 10^5 log per grammo).

Gli Autori fanno notare che, dalle loro esperienze, la decontaminazione dei vegetali freschi con ripetuti lavaggi in acqua è ardua, anche addizionandola di prodotti chimici, che al massimo fanno calare la carica microbica solo di 100 volte.



Per gentile concessione di Ortofrutta “La Primizia” di Fontana Roberto e C. (S.n.c.) a Sirmione (BS).

Curiosamente, la contaminazione batterica sembra interessare solo marginalmente i fiori perché, tutto sommato, questi non trovano uso frequente in cucina. Tra i fiori edibili si citano: crisantemo, calendula, capperi, primula, rosa, viola, zucca. Mentre alcuni di essi vengono cotti (e quindi non danno preoccupazioni sanitarie), altri trovano impiego allo stato crudo come insaporitori, oppure come guarnizioni d'insalate.

Più importante per la salute è invece il discorso sui fiori ornamentali, se considerati in particolari condizioni ambientali.

Kates e Coll. (1991) hanno posto la loro attenzione sui fiori recisi che vengono introdotti negli ospedali e mantenuti in acqua.

La quantificazione dei germi, per motivi pratici, è stata fatta da questi Autori monitorando l'acqua nella quale erano stati posti i fiori ed è stato così possibile appurare che la carica microbica totale si aggirava mediamente su $4,5 \times 10^8$ germi per ml, con larga prevalenza di *Pseudomonas* di 12 specie diverse. Tra questi isolati si notava un'insolita abbondanza di ceppi multiresistenti agli antibiotici.

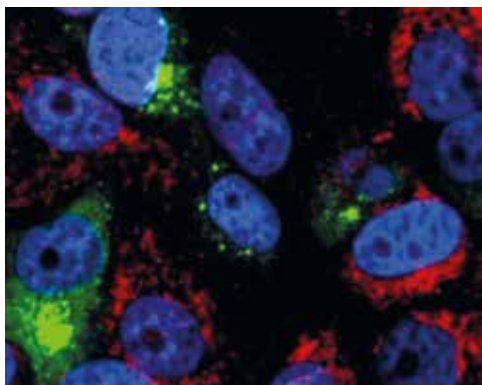
Con opportuni controlli, gli Autori hanno concluso che l'acqua non aveva nessun influsso

sulla contaminazione e che i microbi presenti nei fiori normali (compresi i ceppi multiresistenti) erano indigeni dei fiori stessi.

L'apporto microbico che i fiori (o le piante in vaso) danno in ambienti protetti, come gli ospedali, dovrebbe essere oggetto di maggior attenzione per ovvi motivi di trasmissione dei germi.

VIRUS Le piante, oltre a batteri e funghi, possono ospitare, e quindi diffondere, sia virus fitopatogeni che virus animali. I primi, responsabili di enormi danni alle colture, possono essere diffusi da insetti, da nematodi, da semi ma anche dalla stessa potatura. I secondi, principalmente responsabili di patologie gastrointestinali nell'uomo, la cui trasmissione è stata da tempo legata al consumo di frutta e verdure fresche o congelate, sono, in ordine di importanza: **norovirus**, virus dell'**epatite A (HAV)**, **rotavirus**, **astrovirus** e **adenovirus** enterici.

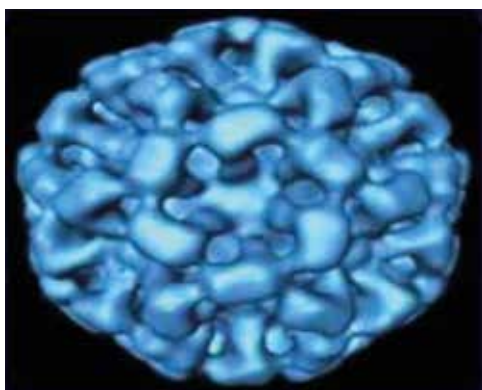
I prodotti ortofrutticoli possono essere contaminati, e quindi essi stessi capaci di veicolare e diffondere i virus, sia prima che dopo la loro raccolta. I virus possono essere acquisiti dal suolo, dall'irrigazione con acqua contaminata, da concimazione organica, da insetti e animali, oppure, nelle fasi di manipolazione successive alla raccolta, dall'intervento di operatori infetti non rispettosi delle più basilari norme igieniche (Hirneisen *e Coll.*, 2012; Di Caprio *e Coll.*, 2012).



Virus epatite A



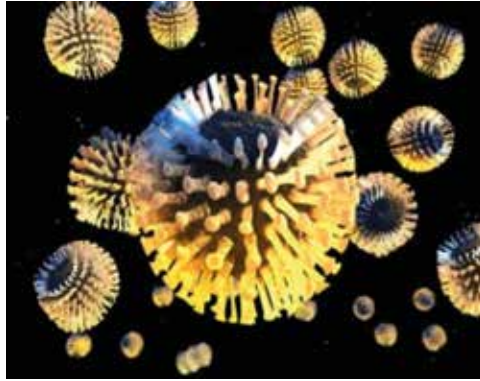
Adenovirus



Norovirus



Astrovirus



Rotavirus

I norovirus, la cui dose infettante è estremamente bassa (meno di 100 particelle virali), sono i principali agenti di gastroenteriti umane di origine alimentare (Hall *e Coll.*, 2012). Studi condotti da Mead *e Coll.* (1999) hanno dimostrato che dei 23 milioni di casi per anno di gastroenteriti acute di origine alimentare riscontrati negli USA, ben il 67% è sostenuta da virus, con netta prevalenza di norovirus (Hirneisen *e Coll.*, 2012).

In Giappone i norovirus sono responsabili del 28% di tutti i casi di patologie da alimenti e del 99% di tutti i casi a eziologia virale (Zaizanor *e Coll.*, 2009).

Indagini condotte in USA, dal 2001 al 2008, hanno dimostrato che i norovirus sono veicolati per il 33% da ortaggi da foglia, per il 16% da frutta con guscio e per il 13% da molluschi (Hall *e Coll.*, 2012).

Un importante fattore di diffusione è rappresentato dalla globalizzazione, che ha portato alla distribuzione a livello mondiale di prodotti ortofrutticoli e con essi anche degli eventuali microrganismi patogeni presenti. Infatti, indagini molecolari hanno dimostrato che infezioni da epatite A riscontrate in USA erano state acquisite attraverso il consumo di ortaggi (cipollotto) contaminati da HAV, importati dal Messico (Hirneisen *e Coll.*, 2012). Analogamente, virus dell'epatite A, aventi sequenze geniche identiche, erano contemporaneamente isolati in Olanda e in Australia da pazienti che avevano consumato pomodori parzialmente essiccati provenienti dalla Turchia.

Nonostante sia ormai da tutti accettato che ortaggi e frutta freschi o congelati rappresentino un importante veicolo di virus animali, poco si conosce sulle vie di trasmissione e delle modalità di persistenza di questi virus nei prodotti ortofrutticoli, adesi sulla superficie o presenti all'interno dell'alimento.

Indagini condotte su colture idroponiche di lattuga hanno dimostrato che l'inoculazione di norovirus a livello radicale determina la presenza di elevati livelli del loro genoma sia nelle radici che nelle foglie (Di Caprio *e Coll.*, 2012). In modo analogo il virus dell'epatite A può essere acquisito a livello radicale di piante mature (esempio: fagiolo, mais e cipollotto, Holmberg, 2012). Di conseguenza, la capacità dei virus di penetrare le radici (e da queste arrivare alle foglie) rende impossibile l'asportazione del patogeno in seguito al lavaggio o al trattamento con sanitizzanti agenti sulla superficie del vegetale.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Abadias M. *e Coll.*, Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments, *Int. J. Food Microbiol.* 2008, *123*, 121-129.
- 2) Di Caprio E., Ma Y., Purgianto A., Hughes J., Li J., Internalization and dissemination of human norovirus and animal calicivirus in hydroponically grown romain lettuce, *A. E. M.* 2012, *78*, 6143-6152.
- 3) Hall A.J., Eisenbart V.G., Etingue A.L., Gould L.H., Lopman B.A., Parashar U.D., Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008, *Emerg. Infect. Dis.* 2012, *18*, 1566-1573.
- 4) Hirneisen K.A., Sharma M., Kniel K.E., Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops, *Foodborne Pathogens Dis.* 2012, *9*, 396-405.
- 5) Holmberg S.D., Hepatitis A epidemiology goes global, *Clin. Infect. Dis.* 2012, *54*, 782-783.
- 6) Johnston L.M. *e Coll.*, A field study on the microbiological quality of fresh produce, *J. Food Prot.* 2005, *68*, 1840-1847.
- 7) Kates S.G. *e Coll.*, Indigenous multiresistant bacteria from flowers in hospital and nonhospital environments, *Amer. J. Infect. Control* 1991, *19*, 156-161.
- 8) Lindow S.E. *e Coll.*, Microbiology of the phyllosphere, *Appl. Environm. Microbiol.* 2003, *69*, 1875-1883.
- 9) Mead, P.S., Slutsker L., Dietz V., Mccaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V., Food-related illness and death in the United States, *Emerg. Infect. Dis.* 1999, *5*, 607-625.
- 10) Rovira A.D., Interactions between plant roots and soil microorganisms, Univ. Melbourne, Thesis, 1986.
- 11) Sivapalasingam S. *e Coll.*, Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997, *J. Food protect.* 2004, *67*, 2342-2353.
- 12) Tournas V.H., *e Coll.*, Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts, *Int. J. Food Microbiol.* 2005, *99*, 71-77.
- 13) Vidaver A.K. *e Coll.*, Bacteria as plant pathogens, *The plant health instructor* DOI 10, 1094/PHI, 2004.
- 14) Zaizanor T., Hidayah M.S.N., Chai L.C., Tunung R., Ghazali F.M., Son R., The scenario of norovirus contamination in food and food handlers. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, *20*, 229-237.
- 15) Zhang B. *e Coll.*, Microbial diversity within the phyllosphere of different vegetables species, *Current Research, technology and education, Appl. Microbiol. and Microbial Biotechnology*, Mendez-Vilas ed., vol. 2, 2010.

Capitolo 2 I MICROBI PATOGENI PER LE PIANTE

ANTONIO MAZZUCCHI

Consulenze fitopatologiche V.P.S srl - Castel San Pietro Terme (Bologna)
consulenzefitopatologiche@gmail.com

INTRODUZIONE

Per malattia di una pianta si intende una deviazione dallo stato di normalità riguardante l'aspetto esteriore e l'attività fisiologica, che comporta danno economico, paesaggistico o ambientale. Fin dai primordi dell'agricoltura l'uomo si rese conto della presenza di malattie. Allevando in aree ristrette piante selezionate, l'agricoltura creò condizioni molto favorevoli al diffondersi di malattie. Il progresso agricolo nei secoli successivi ha accentuato la maggior predisposizione alle malattie delle piante coltivate rispetto alle spontanee. Uniformità genotipica, stato coetaneo delle piante, addensamento in aree ristrette, maggior livello nutrizionale e breve coevoluzione con gli agenti patogeni sono i principali fattori esponenti le piante coltivate al rischio di malattie. Le malattie sono causate da agenti patogeni o semplicemente patogeni distinguibili in biotici e abiotici. Sono patogeni biotici gli organismi viventi o certe entità acellulari capaci di duplicarsi entro cellule viventi. Sono patogeni abiotici gli agenti fisici (es. energia luminosa, alte e basse temperature, potenziale idrico) o chimici (es. anidride solforosa, ozono, principi attivi usati in interventi agronomici). Sono dette infettive le malattie causate da patogeni biotici, non infettive quelle causate da patogeni abiotici.

Una classificazione delle malattie secondo il criterio dell'agente causale è mostrata nella tabella seguente.

Tabella 1.

CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE	
<u>Malattie infettive</u>	<u>Malattie non infettive</u>
ENTITÀ ACELLULARI { Viroidi Virus	Danni da alte temperature. Danni da agenti meteorici (grandine, vento, neve).
PROCARIOTI { Streptomiceti Batteri tradizionali Batteri fastidiosi Fitoplasm Spiroplasm 	Danni da basse temperature. { Congelamento Raffreddamento
EUCARIOTI { Plasmodioforomiceti Mixomiceti Protozoi Oomiceti Funghi Piant Nematodi Insetti	Danni da carenze o eccessi minerali. Danni da carenza di acqua (disidratazione). Danni da carenza di ossigeno (anossia). Danni da inquinanti atmosferici. Danni da eccesso o carenza di luce. Danni da trattamenti chimici. Danni da interventi agricoli impropri.

I VIROIDI

La scoperta dei viroidi fu fatta dall'americano Diener nel 1967 al termine di studi su una malattia della patata detta "tubero affusolato" (ingl.: *potato spindle tuber*), descritta per la prima volta nel 1922 nello stato del Maine (USA), dove era nota da tempo agli agricoltori. Oggi sono note almeno 29 specie di viroidi ripartite in 8 generi e in due famiglie: *Pospiviroidae* e *Avsunviroidae*. Sono stati trovati per ora solo nelle piante superiori. I viroidi sono molecole di RNA circolare a singolo filamento, a basso peso molecolare (80-125kD), costituiti da 246 - 399 nucleotidi, capaci di duplicarsi entro cellule vegetali causando malattia. Differiscono dai virus per il basso numero di nucleotidi e per l'assenza di involucro proteico. La molecola di RNA del viroide non funge da RNA messaggero, anche perché il numero di triplette è insufficiente a codificare una proteina avente dimensioni compatibili con un'attività catalitica; di fatto non si conoscono proteine viroidali. Per la loro attività usano enzimi della cellula ospite, da cui sono strettamente dipendenti. La presenza lungo la catena nucleotidica di tratti aventi basi complementari consente la formazione di strutture secondarie, che per il viroide del tubero affusolato è un bastoncino lungo circa 40 nm (Fig. 1).

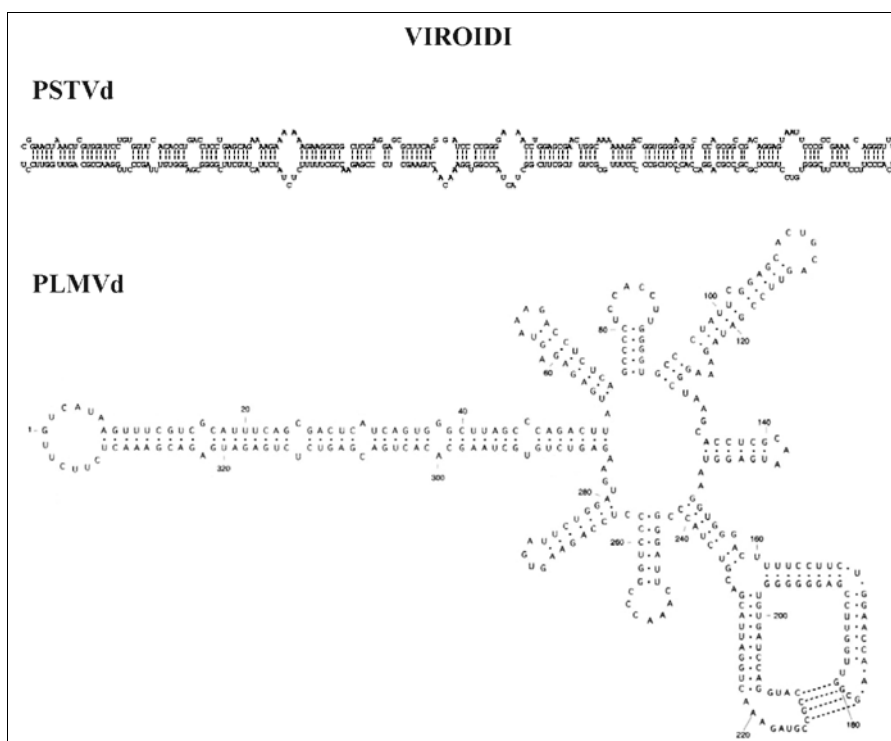


Fig. 1 – Strutture secondarie dei viroidi del tubero affusolato della patata (Potato Spindle Tuber Viroid) (PSTVd) e del mosaico latente del pesco (Peach Latent Mosaic Viroid) (PLMVd). Si notino le anse e le forche nei tratti dove non c'è complementarità delle basi.

Per assenza di complementarità tra le basi in alcuni tratti, lungo il bastoncino si creano anse di varia dimensione. Le anse della parte centrale del bastoncino sono assai conservate tra i diversi viroidi. I viroidi si indicano con una sigla data dalla sequenza delle prime lettere

delle parole inglesi che li descrivono seguite da Vd. Nel bastoncello a doppia catena del viroide del tubero affusolato si distinguono la parte centrale altamente conservata tra due parti terminali e due regioni intermedie, tra quella centrale e le estremità, dette rispettivamente regione di patogenicità e regione variabile.

La loro duplicazione a spese della cellula vegetale avviene in modo simmetrico (*Avsunviroidae*, nei cloroplasti) o asimmetrico (*Pospiviroidae*, nel nucleo). Si suppone siano residui di molecole primordiali di RNA associate alle prime forme di vita sulla terra, prima dell'avvento della vita cellulare. Sono ritenuti sofisticati RNA parassiti delle cellule.

La trasmissione da una pianta all'altra avviene attraverso la propagazione vegetativa o attraverso ferite da taglio. Il PSTVd dopo pochi minuti dalla inoculazione è presente nel nucleo. In qualche caso possono trasmettersi per seme, mentre l'inoculazione per fitofagi è rara (es. per afidi il TMPVd). Il passaggio da una cellula all'altra ha luogo attraverso i plasmodesmi, probabilmente veicolati da proteina dell'ospite; i movimenti a lunga distanza avvengono via floema, dove lungo il percorso il viroide entra in cellule compagne, si replica e poi ritorna nei tubi cribrosi. In presenza di infezione viroidale la pianta può rimanere asintomatica o manifestare alterazioni morfologiche (es. arrotolamento o decolorazioni delle lamine; butteratura del legno, desquamazioni corticali) e di sviluppo (es. nanismo, rachitismo); in qualche caso si ha esito letale. I sintomi si accentuano durante l'estate.

I FITOVIRUS

Un virus è costituito da una o più molecole di RNA o DNA racchiuse entro un involucro proteico (capsidio) o lipoproteico, codificanti proteine virali atte alla sintesi di nuove molecole di acido nucleico, capaci di replicarsi solo all'interno di cellule ospiti usando il loro apparato biosintetico. Non hanno organizzazione cellulare, mancano di ribosomi, non possiedono attività fisiologica propria a fini energetici (ATP). Hanno *habitat* intracellulare senza esser contornati da membrana dell'ospite.

I fitovirus differiscono dai virus zoopatogeni per avere penetrazione passiva nella cellula ospite, per usare proteine speciali di passaggio da una cellula all'altra, per il basso numero di proteine codificate (4-12), per la loro frequente forma tubolare, per avere in certe specie genoma multipartito (suddiviso in particelle distinte), per cui l'infezione ha successo con il concorso di una o più particelle. Circa il tipo di genoma, ci sono fitovirus a doppia o a singola catena di DNA, a doppia o singola catena di RNA; tra quelli più frequenti a singola catena di RNA, la catena può essere di polarità positiva (direttamente tradotta dai ribosomi), negativa (non direttamente traducibile, che deve essere prima trascritta in RNA positivo per essere tradotta in proteine), ambivalente (con tratti positivi e altri negativi). La morfologia delle particelle (virione) è più spesso isodiametrica riferibile a icosaedro (es. *Cucumovirus*, *Ilarvirus*, *Alfamovirus*), a bastoncello rigido (es. *Tabamovirus*, *Furovirus*, *Hordeivirus*) o flessuoso (es. *Potyvirus*) o filiforme (es. *Closterovirus*). Virus a membrana sono i *Tospovirus*: il virione di forma globosa ha un involucro a membrana (derivata in parte dall'ospite) con protuberanze glicoproteiche, entro cui ci sono tre nucleocapsidi pseudocircolari a catena singola di RNA (due - e una +) contornate da subunità proteiche a disposizione elicoidale; ad ogni nucleocapside è associato l'enzima trascrittasi.

La classificazione dei fitovirus è complessa e in continua evoluzione: ci sono almeno 17 famiglie e 50 generi. Comunque sono denominati in base al nome della pianta ospite principale o di quella da cui furono isolati per la prima volta e dal sintomo ritenuto più caratteristico (es. virus del mosaico del tabacco) e indicati con una sigla composta dalla lettera iniziale dei corrispondenti nomi in inglese seguita da V (es. *Tobacco Mosaic Virus* ovvero TMV).

Le principali forme e tipi di fitovirus sono mostrati in Figura 2.

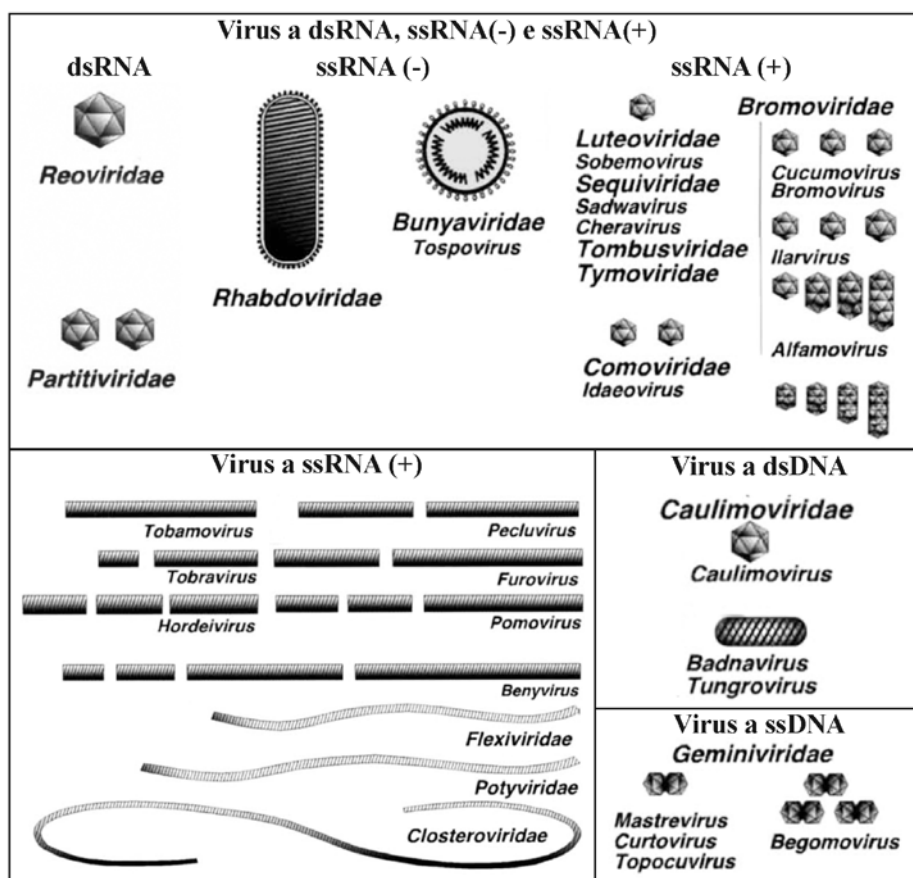


Fig. 2 – Principali famiglie e generi di virus fitopatogeni

La trasmissione può avvenire per contatto diretto o indiretto, per propagazione vegetativa, per seme, per polline e per vettori. Ogni gruppo di virus ha un proprio tipo di trasmissione prevalente. Per contatto diretto si ha quando un organo di pianta infetta sfrega un organo di pianta sana e causa microferite che fungono da punti di evasione dei virioni dalla pianta infetta e di inoculazione su quella sana (es. TMV). Per contatto indiretto si ha durante le operazioni colturali con un utensile o con le mani, quando si passa da una pianta malata a una sana (es. cimatura, scacchiatura).

Ogni organo di propagazione vegetativa (es. rizomi, bulbi, tuberi) prelevato da una pianta infetta o una sua parte (es. gemma, marza, plantula micro-propagata) è in grado di trasmettere il virus al nuovo individuo che genererà.

La trasmissione per seme è caratteristica di alcuni generi di virus, sebbene la percentuale di semi prodotti da una pianta infetta sia di regola assai bassa; riveste un importante ruolo epidemiologico sia per la perpetuazione dell'infezione da un ciclo vegetativo all'altro, sia per la disseminazione del patogeno a grande distanza. Il virus può essere localizzato nell'embrione o nei tegumenti di origine materna o contaminare residui di tessuto infetto aderenti alla superficie del seme (es. TMV).

I granuli di polline possono essere contaminati in superficie oppure inoculare il virus nel sacco embrionale, accompagnando internamente il budello pollinico durante la fecondazione.

Vettori biotici dei fitovirus possono essere artropodi (insetti e acari), nematodi, alcuni protozoi e funghi unicellulari. Il vettore acquisisce il virus durante l'attività trofica (insetti, nematodi e acari) o in una fase del suo ciclo (protozoi e funghi), lo alberga infettivo entro il suo corpo per un periodo più o meno lungo e l'inocula quando ritorna a svolgere la stessa attività su una pianta sana. Nel rapporto virus-vettore si distinguono diversi periodi: acquisizione (1), latenza (2), inoculazione (3) e ritenzione (4). Dopo un certo periodo di attività sull'ospite infetto (1) il vettore acquisisce il virus e lo alberga sulle appendici boccali o internamente; alcuni virus attraversano la parete del tubo digerente, si diffondono nell'emolinfa e raggiungono le ghiandole salivari (2) da cui, raggiunta una certa concentrazione, possono essere espulsi con la saliva; a quel punto il vettore diventa infettivo (fine della latenza). L'inoculazione nell'ospite sano ha comunque successo solo dopo un certo periodo di attività del vettore infettivo (3). Circa il periodo di ritenzione (4) nel vettore, i fitovirus sono distinti tradizionalmente in non-persistenti, semipersistenti e persistenti. Nei non-persistenti il vettore (solo afidi) rimane virulifero, infettivo, per una o poche ore: acquisisce il virus e lo trasmette durante punture di pochi secondi (punture di assaggio); nei semipersistenti rimane infettivo per qualche giorno (es. i virioni sono alloggiati sull'epitelio del tratto iniziale del canale alimentare); nei persistenti rimane infettivo da parecchi giorni a mesi, anche per tutta la vita del vettore; i virioni introdotti nel canale digerente, attraversano l'epitelio dell'intestino, passano nell'emolinfa e infine raggiungono le ghiandole salivari. Tra i fitovirus persistenti si distinguono quelli che si moltiplicano entro il vettore (propagativi) da altri che compiono il percorso interno descritto senza moltiplicarsi (circolativi).

I nematodi vettori di fitovirus, appartenenti ai generi *Xiphinema*, *Longidorus* e *Trichodorus*, hanno apparato boccale pungente succhiatore costituito da uno stiletto cavo, retrattile, alloggiato in condizioni di inattività entro una sorta di guaina nella parte apicale del corpo. In attività lo stiletto è estruso e conficcato perforando la parete all'interno della cellula ospite per la suzione del contenuto. I virioni aspirati col liquido sono trattenuti alla superficie di tratti iniziali del tubo alimentare e inoculati in punture successive trascinati dalla saliva emessa. Per questo motivo i nematodi vettori sono riferibili alla modalità semipersistente di trasmissione.

I protozoi e i funghi vettori di fitovirus sono organismi unicellulari, olocarpici, provvisti di zoospore, a parassitismo obbligato associato ad organi ipogei. I protozoi appartengono ai generi *Polymyxa* e *Spongospora*, i funghi al genere *Olpidium*.

I protozoi hanno come corpo vegetativo un plasmodio polinucleato, circondato da una membrana all'interno di cellule epidermiche, che poi si trasformerà in sporangio quando i numerosi nuclei diverranno entità cellulari primordi delle zoospore. A maturità lo sporangio libera numerose zoospore mobili, biflagellate, in grado di muoversi attivamente nei film liquidi interstiziali del terreno in grado di venire in contatto con peli radicali o cellule epidermiche radicali e di attuare l'inoculazione. A fine ciclo il plasmodio polinucleato dà luogo a spore durevoli, uninucleate che alla morte della radice rimangono associate ai residui della vegetazione. Dalle spore durevoli sopravvissute nel terreno si libereranno al momento opportuno zoospore per infettare nuovi ospiti. Il patogeno è infettato dal virus quando è allo stato di plasmodio, in modo che sia le zoospore che le spore durevoli albergano già virioni al loro interno (acquisizione del virus *in planta*). *Olpidium* ha un ciclo assimilabile a quello dei protozoi, ma si differenzia perché i virioni contaminano la superficie e i flagelli delle zoospore durante i loro movimenti nel terreno (acquisizione del virus nella rizosfera) e vi penetrano infettando le zoospore si incistano poco prima dell'inoculazione nei peli radicali dell'ospite.

I sintomi delle virosi sono molteplici e possono manifestarsi su singoli organi o sull'intera pianta. Sulle foglie i più comuni (e riferibili ad infezioni virali) sono: mosaico, anelli necrotici o clorotici [clorosi= colorazione giallastra], clorosi delle nervature, giallume, arrossamen-

to, accartocciamento, lacinatura. Sui petali può aversi rottura di colore: famosi sono i tepali variegati dei tulipani raffigurati nei dipinti fiamminghi del XVII secolo. Su intere piante si ha spesso nanismo. I sintomi sulle foglie dei virus localizzati nei tessuti epidermici e parenchimatici si rendono spesso più evidenti in primavera e si attenuano in estate (es. mosaici); si ha il contrario per quelli localizzati nel floema, inducenti giallumi e/o accartocciamenti delle foglie, più evidenti durante l'estate (es. giallumi della barbabietola) (Fig. 3).

Per la loro capacità di trasmettersi per mezzo dei materiali di propagazione vegetativa, i fitovirus hanno importanza preminente per il vivaismo tradizionale e micro-propagativo e sono oggetto di legislazione fitosanitaria ai fini della certificazione dei materiali vegetali in commercio. Le infezioni virali sistemiche nelle singole piante e a diffusione progressiva in campo per mezzo di vettori possono deprimere seriamente la produttività delle colture, particolarmente negli alberi da frutto a ciclo poliennale. Sono ben noti attualmente i danni causati dalla diffusione in Italia del *Potyvirus* agente della *sharka* (vaiolatura) nelle drupacee (Fig. 3B).

I MIXOMICETI

I mixomiceti appartenenti al phylum *Myxomycota* del regno *Protista* hanno corpo vegetativo a plasmodio, grossa cellula polinucleata a nuclei diploidi, senza parete, saprofita, ad *habitat* terricolo, dove si nutre fagocitando particelle organiche, batteri o altri microrganismi. In ambiente caldo-umido dagli strati superficiali del terreno il plasmodio può risalire fusti e foglie di piante erbacee di bassa taglia (es. graminacee dei prati, trifoglio, fragola, lattuga *etc.*) e produrre sulle superfici aeree incrostazioni color cenere, portanti masserelle globose dall'aspetto polverulento, più o meno peduncolate, su cui differenziano sporangi ripieni di spore. Le spore disseminate dal vento, dall'acqua o da strumenti contaminati (es. tagliaerba, falci) germinano liberando nel nuovo ambiente zoospore mobili; accoppiandosi come gameti, le zoospore biflagellate generano uno zigote che svilupperà in plasmodio. I mixomiceti non causano malattia, ma la loro presenza alla superficie di fusti e foglie imbratta le piante rendendo certi prodotti non commerciabili o deturpando seriamente tappeti erbosi di giardini, parchi o campi da golf. La loro presenza si accentua in terreni con sostanza organica abbondante e irrigati di frequente (Fig. 4A).

I BATTERI TRADIZIONALI

Per batteri tradizionali si intendono tutti i batteri fitopatogeni coltivabili sui comuni substrati nutritivi agarizzati dei laboratori di batteriologia. Sono i batteri dei generi più noti e dannosi, appartenenti al regno dei Procarioti. La loro classificazione tassonomica, basata principalmente sui risultati della comparazione delle sequenze del 16S rDNA è in continua evoluzione e probabilmente in futuro le conoscenze degli interi genomi batterici contribuiranno a modificarla. La nomenclatura è periodicamente aggiornata. Nel dominio *Bacteria* sono riconosciute 24 linee evolutive, di cui due comprendono 4 classi di batteri fitopatogeni: α -, β -, γ - *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (Gram +). I generi più noti delle famiglie [] più importanti sono: *Agrobacterium* [*Rhizobiaceae*; α]; *Ralstonia* [*Ralstoniaceae*; β]; *Xanthomonas* [*Xanthomonadaceae*; γ]; *Pseudomonas*, *Xylophilus* [*Pseudomonadaceae*; γ]; *Brenneria*, *Dickeya*, *Erwinia* e *Pectobacterium* [*Enterobacteriaceae*; γ]. Tra gli *Actinobacteria*: *Clavibacter*, *Curtobacterium* e *Leifsonia* [*Microbacteriaceae*]; *Rhodococcus* [*Nocardiaceae*].

I batteri tradizionali sono tipiche cellule procariotiche, suddivisibili in due gruppi, Gram-negativi e Gram-positivi; la proprietà delle cellule di decolorarsi nei lavaggi alcolici dipende dalla composizione e dalla struttura della parete cellulare, capace di trattenere più o meno te-

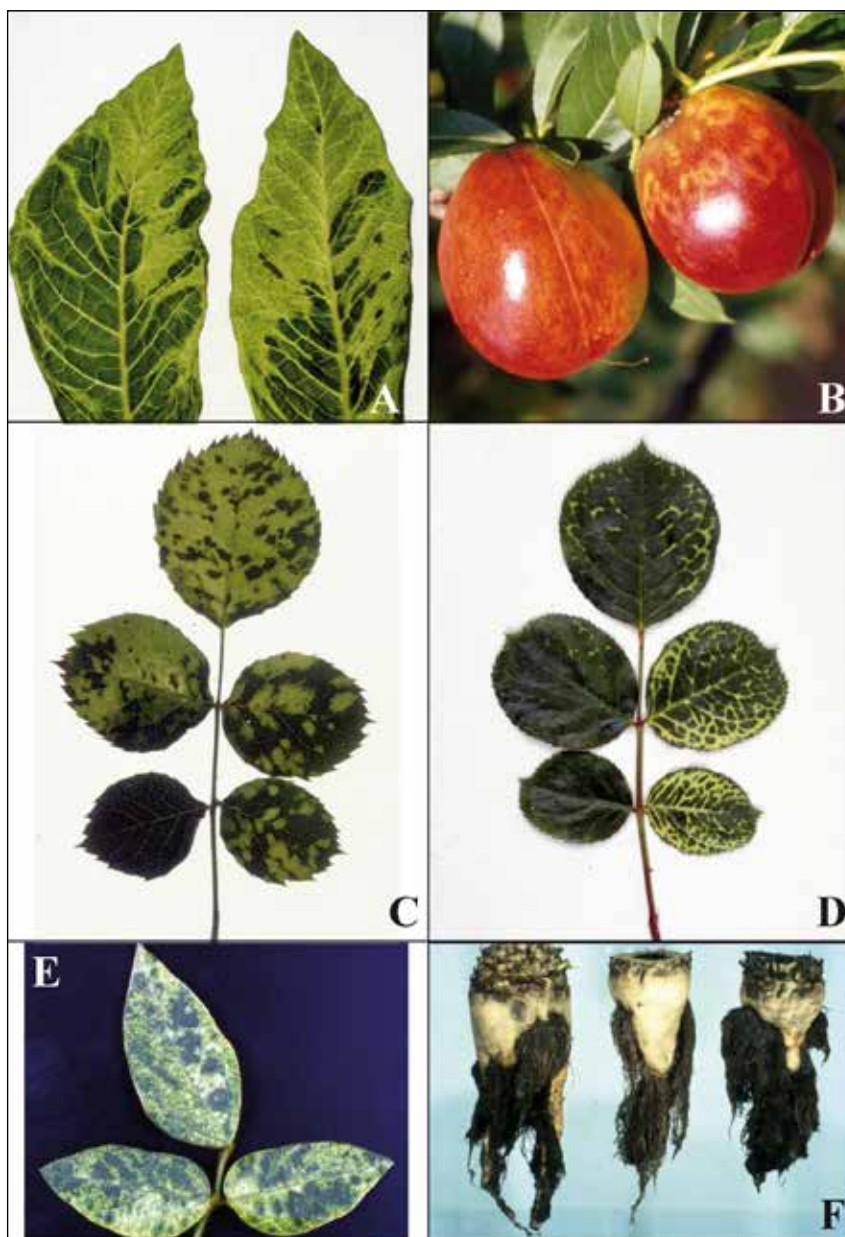


Fig. 3 – Sintomi comuni di virosi nelle piante. A: Mosaico in foglia di tabacco da Tobacco Mosaic Virus (TMV) (Tobamovirus). B: Anelli clorotici su frutto di nettarina da Plum Pox Virus (virus della vaiolatura delle drupacee o virus della sharka) (PPV) (Potyvirus). C e D: Mosaico (C) e clorosi delle nervature (D) su foglie di rosa da Virus della maculatura anulare necrotica dei Prunus (PNRSV) (Ilarvirus). E: Mosaico con isole verdi su foglia di soia da Soybean Mosaic Virus (SMV) (Potyvirus). F: Rizomania in fittoni di barbabietola da Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) (virus della rizomania) (Furovirus).



Fig. 4 – Area di prato imbrattata da incrostazioni color cenere del mixomicete *Physarum polycephalum* (protista mixomicete) su foglie di graminacee (A). B: Tubero di patata con sintomi di rogna nera da *Synchytrium endobioticum* (fungo chitridiomicete); invecchiando le galle anneriscono e degenerano. C: Galle di carbone su fusto di mais ripiene di teliospore nere di *Ustilago maydis* (fungo basidiomicete); le galle in fase giovanile di consistenza carnosa, note per essere commestibili fin dal tempo degli Aztechi, possono essere usate come additivi alimentari e messe in scatola per il commercio. Le galle sono il risultato di ipertrofie e iperplasie di cellule vegetali normali soggette a gravi turbe dei regolatori di crescita indotte dal patogeno presente.

nacemente il violetto di genziana. I bastoncelli hanno lunghezza da 1 a 3 μm , larghezza 0,5-1 μm e comunemente sono singoli o riuniti in brevi catenelle; forme a clava singole o associate a V o in aggregati irregolari (“lettere cinesi”) sono comuni tra i batteri Gram-positivi.

Una cellula batterica è costituita da parete, membrana citoplasmatica e citoplasma. La parete è costituita nei Gram-positivi di un unico involucro, nei Gram-negativi da due parti, lo strato rigido di peptidoglucano e la membrana esterna; tra l'uno e l'altra c'è uno spazio detto periplasmatico, unico comparto funzionale riconoscibile nella cellula batterica. La membrana esterna ha la struttura di membrana biologica (doppio strato fosfolipidico) in cui si trovano inseriti macromolecole lipopolisaccaridi aventi la parte lipidica ancorata tra le catene degli acidi grassi dei fosfolipidi e le catene polisaccaridi esposte verso l'ambiente, protese per 20-40 nm circa. Nel citoplasma, ricco di ribosomi, è presente il cromosoma, molecola anulare a doppia catena di DNA, strettamente impacchettata, costituente il genoma o *replicon* principale; altre molecole anulari, talora lineari, a doppia catena di DNA, di dimensioni assai inferiori rispetto al cromosoma, sono costituite da plasmidi. Alla superficie della cellula batterica vi sono appendici: flagelli e fimbrie. I flagelli sono costituiti da subunità della proteina flagellina, associate in modo elicoidale lungo l'asse del flagello, la cui lunghezza può superare di molto quella della cellula batterica. L'allungamento del flagello è apicale, assicurato dalle subunità di flagellina che sono traslocate lungo un canalicolo interno e si aggregano all'apice. La rotazione del flagello attorno al proprio asse longitudinale, operata da un rotore basale a protoni, permette alla cellula batterica di muoversi a piroette nello spazio. Le fimbrie sono brevi appendici lineari proteiche che consentono l'attaccamento del batterio a superfici solide.

La moltiplicazione ha luogo per schizogonia: duplicazione delle catene del DNA cromosomico, formazione di due cromosomi e separazione delle due cellule figlie. Allo stato endofita hanno *habitat* apoplastico, spazi intercellulari e/o cavità dei vasi o tracheidi dello xilema. La nomenclatura dei ceppi di molte specie è spesso quaternaria, nel senso che al nome della specie e all'epiteto specifico si aggiunge la denominazione della *patovar* (pv.) e della razza (es. *Pseudomonas syringae* pv. *pis*, razza 3: è un ceppo della specie *P. syringae*, patogeno per pisello, appartenente alla razza 3, ovvero non patogena verso le *cultivar* di pisello dotate di gene di resistenza R3, ma virulente verso le *cultivar* che non posseggono quel gene.

I batteri causano maculature su foglie e frutti, avvizzimenti di intere piante, cancri su fusti erbacei o su branche e tronchi, marciumi molli, galle su rami e branche, tumori su radici, colletti e fusti, spesso in forma epidemica. Sono di attualità in Italia le epidemie di cancro batterico della actinidia (*kiwi*) nel Lazio e in pianura padana da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Fig. 5 e 6).

I BATTERI FASTIDIOSI

Per batteri fastidiosi si intendono batteri fitopatogeni coltivabili e non coltivabili in laboratorio. Le forme coltivabili, ad *habitat* vascolare xilematico, crescono esclusivamente su substrati nutritivi particolari, arricchiti di sostanze nutritive e fattori di crescita. La crescita delle loro colonie è assai lenta e soprattutto talora senza apparente motivo si interrompe dopo una serie di trapianti. Le forme non coltivabili, ad *habitat* vascolare floematico, osservabili all'interno delle piante malate con osservazioni istologiche, non ottenibili in coltura pura, sono considerate tassonomicamente allo stato di *Candidatus* ovvero di potenziali specie. Per le loro spiccate esigenze nutrizionali sono stati denominati batteri fastidiosi; tra quelli ad *habitat* xilematico abbiamo *Xylella fastidiosa* (γ -proteobatterio, Fam. *Xanthomonadaceae*), Gram negativo (malattia di Pierce della vite) e *Leifsonia xyli* (Actinobacteria, Fam. *Microbacteriaceae*) Gram-positivo (nella canna da zucchero), tra quelli ad *habitat* floematico *Candidatus Liberibacter africanum* e *C. Liberibacter asiaticus* (α -proteobatterio, Fam. *Phyllobacteriaceae*)

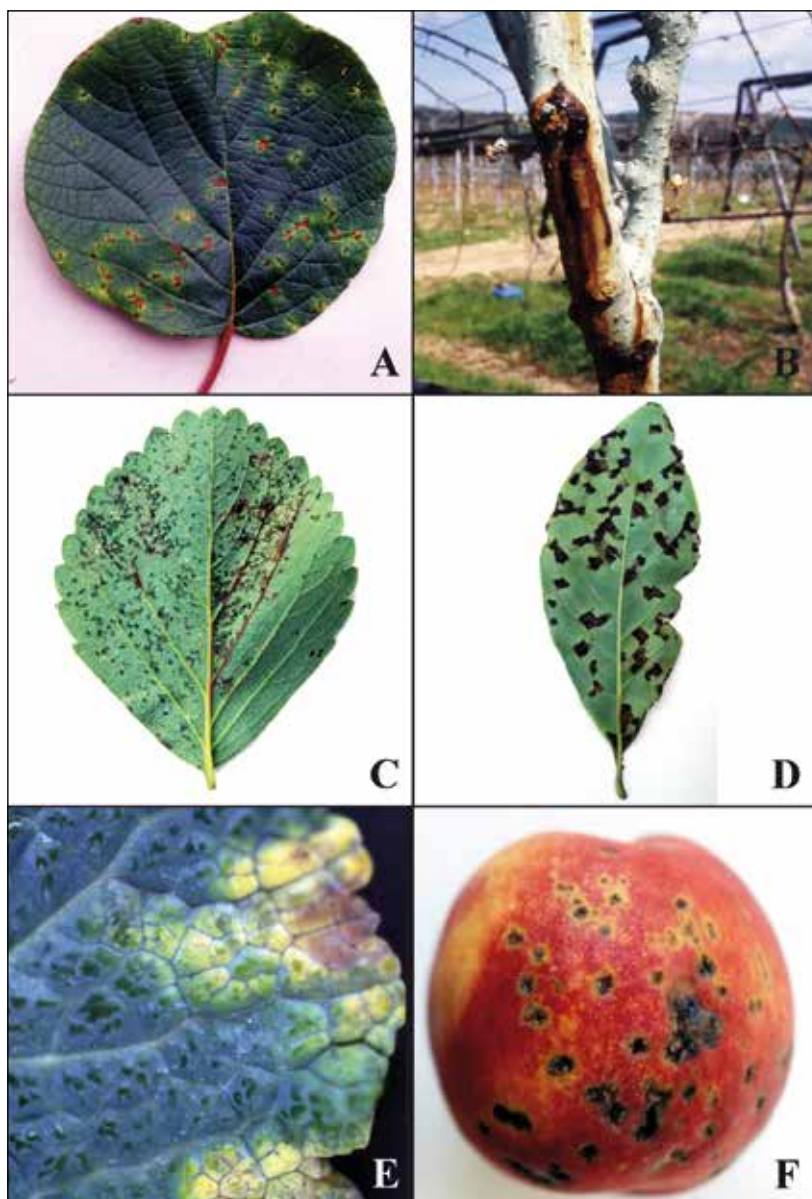


Fig. 5 – Sintomi di batteriosi di interesse agrario. A, B: Cancro batterico del kiwi da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (pseudomonadaceae). Maculature con alone clorotico su foglia (A) e flusso rossastro percolante da tronco infetto (B). C: Maculature idropiche color verde oliva da *Xanthomonas fragariae* (xanthomonadaceae) su foglia di fragola. D: Maculature brune a contorno poligonale, di aspetto umido, da *Pseudomonas syringae* (pseudomonadaceae) su foglia di *Magnolia liliiflora*. E: Aree clorotiche di foglia di verza infette da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (xanthomonadaceae). La reticolatura nerastra delle nervature è caratteristica della infezione. F: Maculature su pesca da *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (xanthomonadaceae).

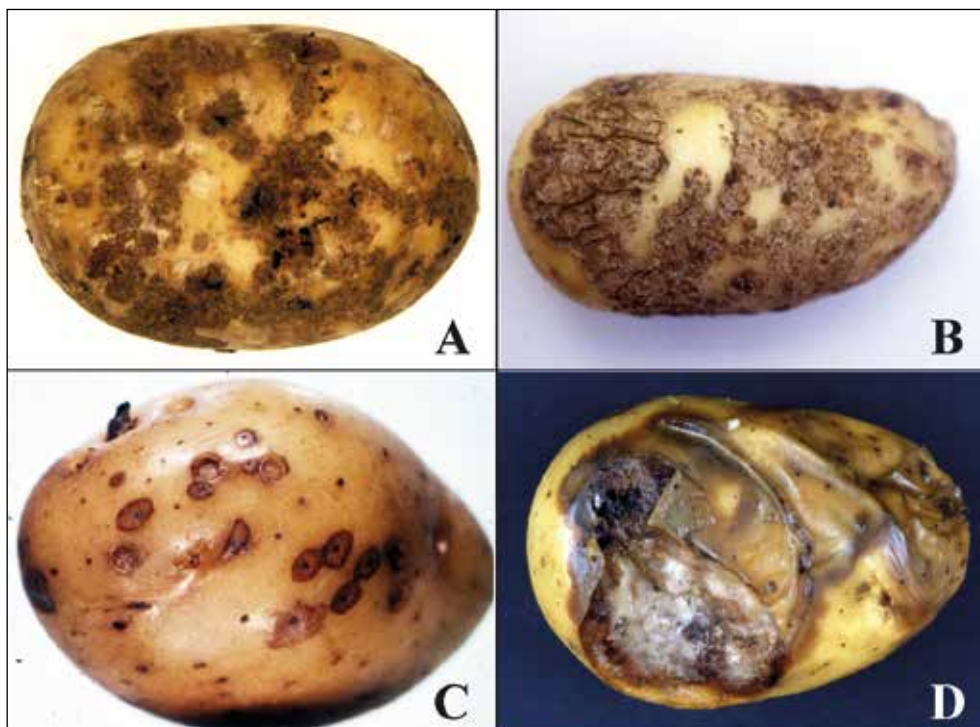


Fig. 6 – Sintomi di malattie sulla patata. A: Scabbia comune da *Streptomyces scabies* (procariote streptomicete). B: Scabbia polverulenta da *Spongospora subterranea* (protista plasmodiofomicete). C: Marciume lenticellare da *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (procariote enterobatterio). D: Marciume molle della polpa da *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (procariote enterobatterio). Entrambi gli enterobatteri sono necrotrofici. Le lesioni di scabbia comune sono superficiali, deprezzano visivamente i tuberi da seme, ma comunemente non comportano fallanze in campo. Le lesioni di scabbia polverulenta sono abbastanza profonde, crateriformi, e possono avviare marciumi secondari e perdita di tuberi. I corpuscoli nerastri associati in figura alla scabbia comune sono croste nere, sclerozi di *Rhizoctonia solani* (fungo a micelio sterile o basidiomicete) tenacemente attaccati alla buccia.

(inverdimento dei frutti di agrumi), *C. Liberibacter solanacearum* (α -proteobatterio, Fam. *Phyllobacteriaceae*) (zebratura della patata); *C. Phlomobacter fragariae* (γ -proteobatterio, Fam. *Enterobacteriaceae*) (clorosi marginale delle foglie di fragola).

La scoperta dei batteri fastidiosi è avvenuta nel 1974 nel corso di studi su una forma di nanismo del trifoglio. Sebbene si notasse entro i tubi cribrosi delle piante malate presenza di una miriade di piccoli batteri, i tentativi di isolamento ebbero insuccesso. La scoperta della specie più nota ebbe luogo circa un decennio dopo quando fu descritto l'agente causale di una forma di disseccamento delle foglie e avvizzimento delle viti detta malattia di Pierce. La malattia, nota in tutte le regioni statunitensi attorno al golfo del Messico, dalla Florida alla California, causa ingiallimenti e disseccamenti cuneiformi a progressione centripeta nelle foglie, avvizzimento dei grappoli e può avere esito letale per le piante. Nel lume dei vasi delle nervature e dei piccioli delle foglie malate si può osservare la presenza di numerose cellule batteriche. I primi tentativi di isolare questi batteri endoxilematici non ebbero successo. Solo nel 1987

si riuscì a coltivarli su substrati arricchiti e ad ottenerli in coltura pura. Si dimostrò che l'agente della malattia di Pierce era un batterio Gram-negativo inusuale e si descrisse la nuova specie *Xylella fastidiosa*. In anni successivi si scoprì che altre forme della stessa specie erano responsabili di deperimenti di altre piante.

Questo batterio ha cellule bastoncelliformi, aventi una membrana esterna assai circonvolta. Ha come vettori cicadellidi (cicadellidi e cercopidi). Potenziali vettori in Europa, dove finora è assente, sono cicalina verde (*Cicadella viridis*) e sputacchina media (*Philaenus spumarius*). I vettori sono insetti che si nutrono nello xilema ed hanno capo voluminoso per il grande sviluppo dei muscoli della potente pompa cibaria necessaria a creare una depressione tale da aspirare il liquido xilematico, avente un potenziale di pressione negativo nella pianta traspirante. Acquisito in meno di 2 ore, il batterio si moltiplica nell'insetto creando colonie a palizzata sull'epitelio di un tratto iniziale del tubo digerente; dall'area colonizzata a tappeto il batterio è immesso nella pianta ospite durante i rigurgiti. Altre piante coltivate ospiti di *Xylella fastidiosa* sono mandorlo, susino, pesco, agrumi, quercia; il batterio alberga anche dentro i vasi di piante erbacee spontanee, dove i vettori possono prelevare e trasferirlo nelle piante coltivate.

I FITOPLASMI

La scoperta dei fitoplasmi risale al 1967 quando ricercatori giapponesi a seguito di osservazioni ultrastrutturali al microscopio elettronico osservarono la presenza di numerosi procarioti nel floema di piante affette da giallumi, diagnosticati fino a quel momento come conseguenze di infezioni virali. I fitoplasmi sono procarioti, piccoli batteri fitopatogeni, viventi nei tubi cribrosi di numerose specie vegetali, trasmessi da specifici fitofagi vettori con apparato boccale pungente succhiatore, appartenenti all'ordine degli Emitteri (Cicadellidi, Fulgoridi e Psillidi). Morfologicamente simili ai micoplasmi degli animali, di regola non sono coltivabili in laboratorio su substrati nutritivi, sebbene di recente per qualcuno di essi la coltura *in vitro* abbia avuto successo. Le loro cellule, prive di parete, sono pleomorfe, spesso con forma globosa di diametro 175-250 nm, altre volte filamentose e spiralate, contengono citoplasma, ribosomi e un cromosoma a DNA di 530-1130 Kb, corrispondenti a circa 671-754 geni, oltre a plasmidi circolari. Si riproducono per scissione binaria o gemmazione. La dimensione ridotta del loro genoma rispetto ai batteri tradizionali (circa 1/5-1/10) è senza dubbio conseguenza dell'adattamento alla vita intracellulare floematica. Sorprendentemente non posseggono vie metaboliche fondamentali come glicolisi, sintesi di ATP, ciclo di Krebs, sintesi di nucleotidi, di amminoacidi e di acidi grassi. Per i processi vitali sono strettamente dipendenti dalle cellule compagne dei tubi cribrosi. Non posseggono sistema di secrezione III. Non hanno motilità propria. Sono sensibili a tetraciclina e cloramfenicolo, ma non alla penicillina. Da un punto di vista evolutivo deriverebbero da una linea di *Firmicutes* (Gram +), affine agli *Acholeplasma*, divergente da *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Bacillus* e *Streptococcus*. L'impossibilità di averli in coltura pura ha costretto a designarli come *Candidatus*, ad indicare potenziali future specie analogamente a certi batteri fastidiosi. Sono stati descritti 25 *Candidatus*, di cui i più importanti per l'Italia sono *C. Phytoplasma mali* (scopazzi del melo ovvero *apple proliferation*), *C. Phytoplasma pyri* (moria del pero ovvero *pear decline*), *C. Phytoplasma solani* (*stolbur*) e *C. Phytoplasma vitis* (flavescenza dorata della vite ovvero *flavescence dorée*).

Le piante affette da fitoplasmi possono essere sintomatiche o asintomatiche. I sintomi paiono conseguenza di gravi alterazioni dell'equilibrio ormonale e della espressione genica (es. virecenza, fillodia, scopazzi, nanismi, deperimenti progressivi anticipati da clorosi o arrossamenti delle foglie). Talora le piante sono tolleranti e i sintomi sono lievi. Nel caso della poinsettia (Stella di Natale) il nanismo indotto dal fitoplasma infettante è vantaggioso economicamente (Fig. 7).



Fig. 7 – Sintomi da fitoplasmi nelle piante. A: Stella di Natale (*Euphorbia pulcherrima*) in vaso. L'infezione di un fitoplasma ha reso la pianta nana, adatta alla coltivazione in vaso, apprezzata come pianta ornamentale da appartamento nel periodo natalizio. B: Virescenza in infiorescenze di astro. C: Fasciazione e scopazzi in garofano. Scopazzi di piante erbacee possono essere causate anche dal batterio *Rhodococcus fascians*. D: Fillomania in pianta di ortensia. E: Deperimento di un susino causato dal fitoplasma della Leptonecrosi (Foto Giunchedi). F: Scopazzi da fitoplasma su fusto di rovo (Foto Giunchedi).

La disseminazione ha luogo per mezzo dei fitofagi vettori che si nutrono del liquido dei tubi cribrosi, introducono nell'intestino il succo contenente le cellule del fitoplasma e lo trasmettono da pianta a pianta nel corso di nuove punture attraverso la saliva. La gamma delle piante ospiti e degli insetti vettori varia in rapporto al ceppo. Alcuni possono essere trasmessi da un vettore polifago su un gran numero di specie vegetali (es. l'agente del giallume dell'astro su 191 specie di 42 famiglie); altri sono abbastanza specie-specifici come, ad esempio, l'agente del giallume dell'olmo trasmesso da un vettore monofago o oligofago *Scaphoideus luteolus* solo su specie del genere *Ulmus*. Trascorrono l'inverno entro i fitofagi vettori o in piante poliennali, alberi compresi. Facile disseminazione si ha anche attraverso la propagazione vegetativa delle piante (es. innesti, bulbi, tuberi, talee).

Nell'insetto vettore i fitoplasmi possono trovarsi in tutti gli organi. Introdotto nel canale alimentare attraversano la parete intestinale, passano nell'emolinfa da dove sono traslocati nelle varie parti. Dopo circa 3 settimane (latenza), la loro concentrazione nelle ghiandole salivari è tale da rendere infettivo il vettore al momento di emissione della saliva pungendo un nuovo ospite. La latenza varia comunque tra i differenti vettori. Anche il periodo di acquisizione è variabile: per uno psillide è stato calcolato 2-4 giorni. Divenuto infettivo, il vettore rimane tale per il resto della vita, incluso il periodo di svernamento; in pochi casi è stato evidenziato il passaggio nelle uova. La presenza del fitoplasma in certi casi nuoce al vettore, in altri casi pare abbia effetti favorevoli (es. longevità, maggiore fertilità e capacità di svernare).

GLI SPIROPLASMI

Sono organismi procarioti, privi di parete, assai simili ai fitoplasmi, di cui condividono molti caratteri. Differiscono dai fitoplasmi principalmente per avere anche cellule filamentose spiralate di dimensioni relativamente grandi, per essere coltivabili in laboratorio su substrati nutritivi appropriati e, pertanto, ottenibili in coltura pura. Similmente ai fitoplasmi derivano da una linea evolutiva dei *Firmicutes* (Gram +), affini più ai *Mycoplasma* che non agli *Acholeplasma*. Le cellule degli spiroplasma sono pleomorfe, globose, aventi diametro di 0,1-0,8 µm o filamentose elicoidali o non-elicoidali ramificate mobili. Le forme filamentose possono avere diametro di 120 nm e lunghezza di 2-4 µm durante la crescita attiva fino a raggiungere anche 15 µm a fine crescita. Le forme filamentose spiralate sono mobili in ambiente liquido per ondulazione e rotazione, mancando di flagelli. Sui substrati nutritivi hanno crescita molto lenta e producono colonie piccole a forma di "uovo fritto". Si riproducono per scissione. Come i fitoplasmi sono sensibili a tetraciclina e cloramfenicolo, ma non alla penicillina ed albergano nei tubi cribrosi del floema. Il rapporto con i vettori e la trasmissione sono simili a quelli descritti per i fitoplasmi. Sono noti spiroplasma zoopatogeni (es. nell'ape) e saprofiti, epifiti (es. sui fiori) o endofiti in piante asintomatiche.

Gli spiroplasma più noti sono *Spiroplasma citri*, agente dello *stubborn* degli agrumi e *Spiroplasma kunkeli*, agente del nanismo e malformazioni del mais. Nanismo delle piante, delle foglie e dei frutti, clorosi nervale delle foglie e malformazioni dei frutti sono i principali sintomi sugli agrumi. Nanismo delle piante, malformazione, arrossamenti e striature clorotiche delle foglie, scopazzi e sterilità dei pennacchi sono i sintomi principali su mais.

GLI STREPTOMICETI

Sono procarioti terricoli, batteri aerobi, aventi il corpo vegetativo filiforme ramificato, di spessore 0,5-1,0 µm, di lunghezza indefinita, a parete Gram-positiva, spesso privo di pareti trasversali durante la crescita vegetativa avente luogo all'apice dei filamenti. Sebbene i filamenti abbiano di-

mensioni “batteriche”, il loro insieme assomiglia al micelio dei funghi, donde la denominazione di pseudomicelio. Da un punto di vista evolutivo costituiscono una linea di *Actinobacteria* (Gram +), divergente da *Clavibacter*, *Leifsonia*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus*, riferiti alla Famiglia *Streptomycetaceae*. Sono coltivabili su substrati di laboratorio. Dallo pseudomicelio delle colonie mature sviluppano filamenti verticali, aerei, detti sporofori; lungo gli sporofori a seguito di formazione di pareti trasversali si separano elementi unicellulari, che distaccandosi l’uno dall’altro danno luogo a singoli propaguli detti “conidi”. Gli sporofori e i conidi spesso pigmentati insieme allo pseudo-micelio conferiscono colore alle colonie, oltre all’aspetto polverulento. Sono comunemente saprofiti viventi nel terreno, cui conferiscono il caratteristico odore per mezzo delle geosmine volatili che producono. Gli unici streptomiceti trattati in patologia vegetale sono gli agenti di scabbie di organi ipogei, patate e batate. L’agente della scabbia comune dei tuberi di patata, *Streptomyces scabies*, ha uno pseudomicelio di sottili filamenti di diametro circa 1 µm, ramificati senza setti trasversali e sporofori spiralati. I conidi germinano ad entrambe le estremità (Fig. 6).

I PLASMODIOFOROMICETI

I plasmodioforomiceti fitopatogeni, appartenenti al regno dei Protisti, fitotomixei del supergruppo *Rhizaria* della classe *Sarcodina*, hanno un corpo vegetativo costituito da un plasmodio, protoplasto cellulare polinucleato, senza parete, intracellulare all’ospite. La definizione della loro posizione tassonomica è attualmente oggetto di studi filogenetici.

Il plasmodio è racchiuso entro un comparto, simile a vacuolo, delimitato da una membrana della cellula ospite e, in tal caso, attorno alla membrana citoplasmatica del plasmodio c’è un ristretto spazio interfacciale; in certi casi la membrana citoplasmatica del plasmodio è a diretto contatto con il citoplasma della cellula ospite. I plasmodi sono statici, senza movimenti ameboidi e fagocitosi. Il ciclo dei plasmodioforomiceti comprende una fase primaria producete zoosporangi a parete sottile aggregati a gruppi (detti sori) entro i peli radicali e una fase secondaria producete spore durevoli aploidi a parete ispessita, forme quiescenti che alla ripresa di attività liberano zoospore. Disgregandosi la parete della cellula del pelo radicale, gli zoosporangi sono liberati nella rizosfera dove germinano e producono zoospore primarie, aploidi, biflagellate, mobili, che possono infettare nuovi peli o accoppiarsi producendo zoospore zigote anch’esse infettive. Dalle infezioni delle zoospore secondarie, diploidi, hanno origine infezioni più profonde, colonizzate dai plasmodi secondari che produrranno le spore durevoli. Caratteristica dei plasmodioforomiceti è la mitosi a croce in certi passaggi del loro ciclo. I nuclei diploidi dei plasmodi secondari, associati alle lesioni più gravi di malattia, vanno soggetti a meiosi per generare i nuclei aploidi attorno cui si differenziano le spore durevoli. Ai plasmodioforomiceti appartengono i generi *Plasmodiophora*, *Polymyxa* e *Spongospora*. I più noti patogeni sono *Plasmodiophora brassicae*, agente dell’ernia del cavolo e *Spongospora subterranea*, agente della scabbia polverulenta delle patate (Fig. 6). In *Plasmodiophora* la presenza del plasmodio nelle cellule induce ipertrofia coinvolgente anche cellule limitrofe non colonizzate. I tre generi sono noti anche come pericolosi vettori di virus fitopatogeni (es. *Polymyxa betae* per il virus della rizomania della barbabietola da zucchero).

GLI OOMICETI

Sono organismi eucarioti appartenenti alla classe *Oomycota* del regno *Chromista* (= *Stramenopila*) e non al regno dei Funghi, comprendente 6 ordini di cui *Saprolegniales* e *Peronosporales* sono i più importanti per la fitopatologia (Alexopoulos e Coll., 1996; Deacon, 2006).

Comprendono forme unicellulari olocarpiche o filamentose eucarpiche, acquatiche o terre-

stri. Tra le forme terrestri, per massima parte fitopatogene, si annoverano le peronosspore e le fitoftore, agenti di gravi malattie di piante coltivate. La peronospora della patata è tristemente nota per le gravi conseguenze sociali delle sue epidemie.

Si distinguono dai veri funghi per vari caratteri tra cui i principali sono: 1) la riproduzione asessuale ha luogo per zoospore aventi due flagelli, uno lungo rivolto in avanti e uno breve rivolto all'indietro; 2) il corpo vegetativo ha nuclei diploidi e la meiosi ha luogo al momento della formazione dei gametangi (oogoni ♀; anteridi ♂). I nuclei diploidi sono spesso distribuiti alla periferia del lume dell'ifa, mentre la parte centrale è occupata da un grosso vacuolo che si differenzia da una certa distanza in poi dall'apice ifale; 3) la riproduzione sessuale ha luogo a seguito di contatto dei gametangi e produce una cellula a parete ispessita detta oospora; 4) la parete cellulare è costituita principalmente da β -glucani (β -1,3 e β -1,6 glucani) e contiene cellulosa (4-20%) e idrossiprolina; questa diversa composizione di parete è responsabile principalmente della inefficacia di certi fungicidi nei confronti degli oomiceti.

Gli oomiceti fitopatogeni hanno corpo vegetativo costituito da ife cenocitiche, ramificate, senza setti trasversali, plurinucleate. Setti trasversali si formano quando si differenziano i gametangi (oogoni e anteridi) o quando si riparano ferite o in ife vecchie assai vacuolate. La crescita delle ife è apicale, come nei funghi, sebbene all'apice siano presenti solo micro-vescicole.

Gli oomiceti fitopatogeni possono essere biotrofici o necrotrofici. Allo stato endofita le ife delle forme biotrofiche hanno percorso intercellulare con ramificazioni laterali dette austori introdotte entro le cellule della pianta ospite, circonscritte da una invaginazione della loro membrana citoplasmatica.

Le forme necrotrofiche (es. gen. *Pythium*, certe specie di *Phytophthora*) hanno ife che si accrescono dentro o attraverso il lume delle cellule vegetali morte o moribonde. Le forme necrotrofiche possono essere coltivate in laboratorio (es. *Phytophthora*, *Pythium*), quelle biotrofiche di regola no (es. *Plasmopara*).

La riproduzione asessuata nella maggior parte delle specie ha luogo per zoospore liberate da zoosporangi. Un'estremità o un'appendice laterale dell'ifa si rigonfia e genera una struttura globosa, ovale o limoniforme detta sporangio. Le zoospore si differenziano entro lo sporangio (es. *Plasmopara*) o entro una vescicola globosa evanescente che fuoriesce dal lume dello sporangio (es. *Pythium*, certe specie di *Phytophthora*). La liberazione avviene per rottura della parete dello sporangio o dell'involucro della vescicola.

Le zoospore possono essere di due tipi: primarie e secondarie; quelle primarie (primitive) sono piriformi con i due flagelli attaccati al polo più ristretto; quelle secondarie, assai comuni, hanno forma di fagiolo con i due flagelli attaccati al centro della concavità laterale. Il flagello più lungo, ricoperto di brevi appendici (peli), è rivolto in avanti, l'altro più corto all'indietro; l'angolo tra i loro tratti basali è di circa 130°.

Gli sporangi di certe specie in condizioni ambientali particolari (es. temperature più alte) non producono zoospore, ma germinano direttamente dando luogo a un tubo germinativo (germinazione diretta; es. peronospora della patata); in altre specie fitopatogene terrestri non ci sono più sporangi, ma solo conidi aventi germinazione diretta come quelli dei funghi (es. peronospora del tabacco).

Le zoospore con i loro flagelli nuotano in acqua per poco tempo compiendo brevi percorsi alla ricerca della pianta ospite. Trovato il punto più appropriato di penetrazione, si incistano e poi germinano, generando un tubo germinativo che penetrerà nell'ospite. Sono noti tropismi positivi delle zoospore in movimento e dei tubi germinativi.

Gli oomiceti sono agenti di gravi malattie delle piante in ambiente agrario e naturale. Sono ben note le conseguenze economiche e sociali delle devastanti epidemie di peronospora della patata in Irlanda verso la metà dell'ottocento e negli anni recenti i disastri ambientali in California per la moria delle querce da *Phytophthora ramorum* (*Sudden Oak Death*). La peronospora è tutt'ora una delle principali malattie della vite (Fig. 8).

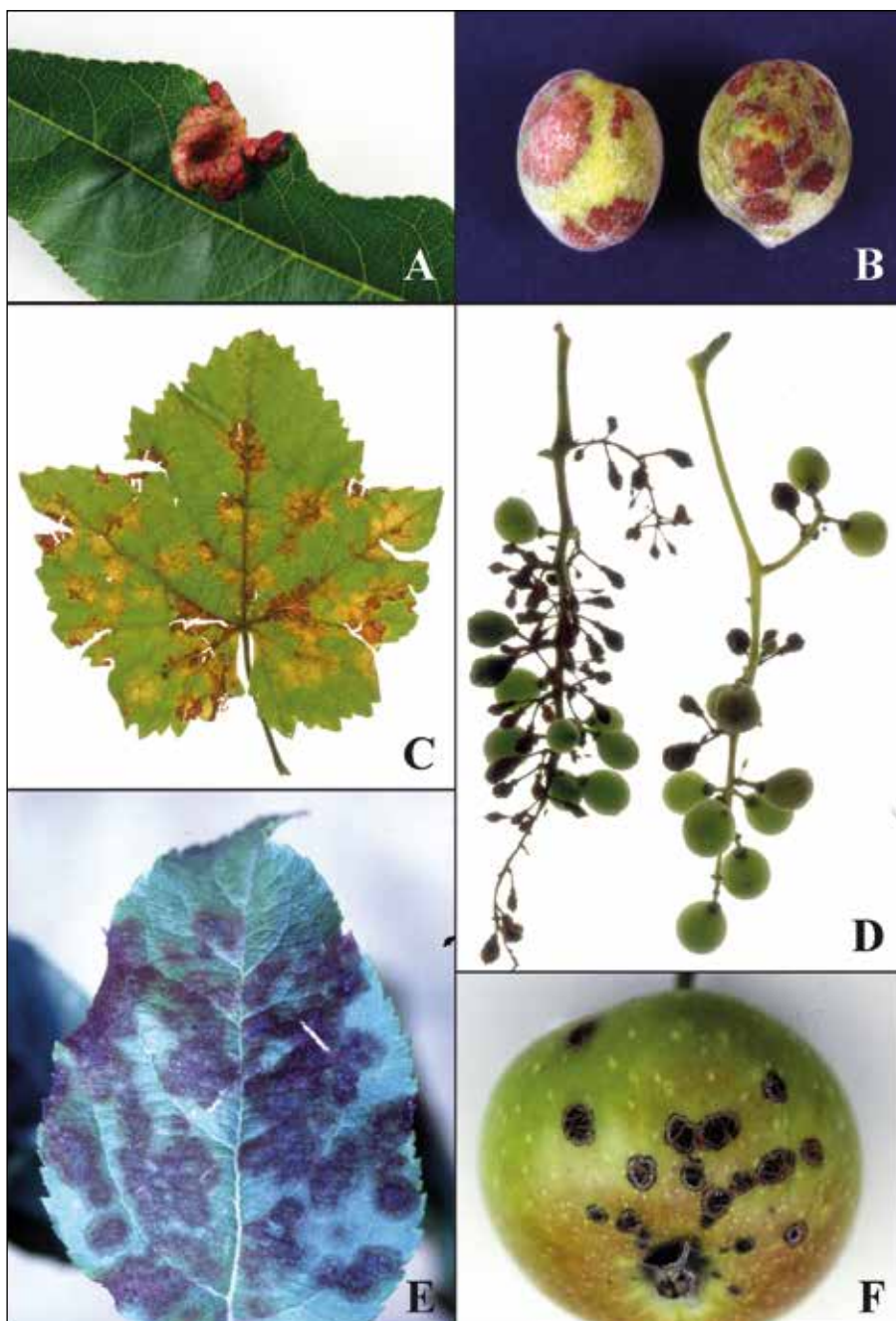


Fig. 8 – Sintomi di micosi di interesse agrario. A, B: Bolla del pesco da *Taphrina deformans* (ascomicete) su foglia e frutti. C, D: *Peronospora* della vite da *Plasmopara viticola* (oomicete) su foglia (“macchie d’olio” e maculature brune) e su grappolo (necrosi di acini). E, F: Ticchiolatura del melo da *Venturia inaequalis* (ascomicete) su foglia (maculature fuliginose) e su frutto.

I FUNGHI

I funghi appartenenti all'omonimo regno *Fungi* (*Mycota*) sono organismi eucarioti, eterotrofi, privi di clorofilla, unicellulari olocarpici o più spesso pluricellulari eucarpici. Sono suddivisi in 4 *Phyla*: *Chytridiomycota* (chitridiomyceti), *Zygomycota* (zigomiceti), *Ascomycota* (ascomiceti) e *Basidiomycota* (basidiomiceti) (Deacon, 2006). Il loro corpo vegetativo è costituito da ife, strutture tubulari, filiformi, ramificate, aventi crescita apicale. Solo tra gli zigomiceti ci sono forme a ife cenocitiche. Le ife vegetative pluricellulari contengono di regola un solo nucleo per cellula negli ascomiceti, due nuclei nei basidiomiceti (stato di *dicarrion*). L'insieme delle ife costituisce il micelio. Alcuni funghi, detti lieviti (ascomiceti, classe *Saccharomycetes*) si moltiplicano per gemmazione o scissione; altri funghi sono dimorfici e possono presentarsi come cellule singole o come ife in rapporto alla nicchia che li ospita.

L'ifa ha parete tubolare, sottile, spesso trasparente (ialina), suddivisa in cellule da setti trasversali (ife settate) provvisti di poro centrale o serie di pori, attraverso cui le cellule sono intercomunicanti e c'è continuità dei loro protoplasti. Ogni cellula può contenere uno o due nuclei in rapporto alla specie e alla fase di vita del fungo. Attraverso il poro centrale possono essere traslocati organelli intracellulari, incluso il nucleo. Il protoplasto della cellula fungina esercita una pressione positiva contro la parete. La parete si compone di uno strato interno di microfibrille e uno strato esterno di matrice amorfa. Le microfibrille, responsabili delle proprietà meccaniche, sono aggregati ordinati, cristallini, di β -glucani (β -1,3 e β -1,6) e di chitina, omopolimero a residui di N-acetilglucosamina con legami β -1,4. La matrice è costituita principalmente da polisaccaridi per lo più idrofili e da glicoproteine. Varie altre sostanze possono essere presenti in piccole quantità, in particolare melanine.

L'ifa ha crescita apicale. Nel citoplasma della cellula apicale dell'ifa, in una zona entro 2-3 μm dall'apice, c'è un accumulo di vescicole, distinguibili per diametro in macro-(>100 nm) e micro-(<100 nm) vescicole. L'aggregato fu chiamato *Spitzenkörper* (corpi della punta) dai primi microbiologi tedeschi che li osservarono. Le macrovescicole contengono oligomeri dei polimeri per la costruzione di nuova parete, le microvescicole enzimi extracellulari, inclusa la chitin-sintasi per la sintesi della chitina. La liberazione dei materiali ha luogo per esocitosi. Alla superficie delle ife sono presenti strutture filiformi aventi circa 7 nm di diametro e 3 μm di lunghezza, simili ai pili o alle fimbrie dei batteri.

Tra i materiali secreti dalle cellule fungine giova ricordare le idrofobine, piccole proteine idrofobiche, aventi peculiare struttura primaria, capaci di autoaggregarsi per costituire una struttura anfipatica, stabile, simile a membrana con una faccia idrofobica e l'altra idrofila. Le pareti delle ife e dei conidi dei funghi sono in molti casi ricoperti da idrofobine in modo da avere superfici idrorepellenti. Il fenotipo "crescita filamentosa" è correlato positivamente alla presenza di idrofobine alla superficie delle pareti cellulari, tanto che anche gli streptomiceti a corpo vegetativo filamentoso, pur essendo procarioti, posseggono idrofobine. Le idrofobine svolgono importanti ruoli nella patogenesi e nell'epidemiologia.

I funghi possono avere riproduzione sessuata o asessuata. La riproduzione sessuata è peculiare di ognuno dei 4 *phyla* in cui è suddiviso il regno. Spore sessuate sono quelle generate nel corso della riproduzione sessuata (es. zigospore, ascospore, basidiospore). La forma più comune di riproduzione è quella per mezzo di spore asessuate, monocellulari o pluricellulari, aventi dimensioni e morfologia assai variabili tra le specie (Fig. 10). Le spore asessuate si possono formare entro sporangi e sono dette sporangiospore o all'estremità o a lato di una ifa e sono dette conidi. I conidi (dal greco "polverina") sono formati all'interno o alla estremità di conidiofori; nel primo caso il conidioforo è una cellula laterale a forma di fiala (fialide) entro cui si differenziano i conidi, espulsi l'un dopo l'altro attraverso un'apertura distale; nel secondo caso il conidioforo può essere semplice o ramificato, i conidi si differenziano all'apice e rimangono attaccati per mezzo di un sottile istmo di contatto tra la parete del conidio e quella del conidioforo.

Le sporangiospore possono essere non mobili (aplanospore) o mobili (zoospore). Tra i funghi solo i chitridiomyceti producono zoospore; esse differiscono da quelle degli oomiceti per avere un solo flagello attaccato alla parte posteriore della cellula, suddiviso in un tratto prossimale lungo e un tratto distale breve, ma assai flessibile.

Le spore asessuate hanno ruolo preminente nello scoppio delle epidemie ai danni delle piante coltivate. Le spore sessuate o asessuate germinano producendo un tubo germinativo, da cui per allungamento si avrà una giovane ifa; fanno eccezione i lieviti e i chitridiomyceti olocarpici (es. *Olpidium*, *Synchytrium*) (Fig. 4).

La riproduzione asessuata dei funghi può aver luogo anche per mezzo di pezzi di ifa, di singole cellule generate dalla frammentazione di ife (artrospore), di singole cellule di una ifa trasformate in clamidospore per ispessimento di parete, aumento di volume e accumulo di sostanze di riserva o di strutture ifali come sclerozi (Fig. 6) e rizomorfe. Nei trapianti di laboratorio si usano comunemente frammenti di ife prelevate al bordo delle colonie.

I cicli vitali dei funghi presentano diversità inter-gruppo e intra-gruppo: in alcune specie c'è regolare alternanza di riproduzione sessuata e asessuata, in altre si conosce solo la riproduzione sessuata (funghi sterili, es. gen. *Sclerotium*).

I funghi sono agenti di gravi malattie su piante in ambiente agrario e naturale (Fig. 8). Nei secoli passati le colture dei cereali furono costantemente minacciate da epidemie di ruggine, di carbone e di carie.

La segale cornuta per secoli in Europa causò intossicazioni di intere popolazioni per la presenza di alcaloidi nelle farine, dove erano stati macinati sclerozi del fungo insieme alle cariossidi (Fig. 11).

La grafiosi e il cancro colorato stanno causando la morte di migliaia di olmi e di platani, rispettivamente in ambiente naturale, agrario e urbano (Fig. 9).

IL PROCESSO INFETTIVO

Tutti i microbi descritti hanno strategie differenti per invadere le loro piante ospiti, acquisire nutrienti e moltiplicarsi. All'interno della pianta i microbi possono avere *habitat* apoplastico (negli spazi tra cellula e cellula, tra le loro pareti) o simplastico (all'interno della cellula nel citoplasma e/o nel nucleo). Il simplasto offre una gamma di nutrienti molto superiore a quella dell'apoplasto, ma l'ambiente intracellulare è assai selettivo nei confronti della presenza di entità estranee viventi.

Per le strategie infettive adottate, i microbi patogeni si distinguono tradizionalmente in necrotrofici, biotrofici ed emibiotrofici. I necrotrofici esprimono strumenti di aggressione violenti (es. enzimi degradativi, tossine) che uccidono le cellule vegetali, e usano i nutrienti che sono liberati (es. microbi del marciume molle) (Fig. 6C e D; Fig. 9 B e C); i biotrofici, mediante la secrezione di fattori di virulenza sofisticati, condizionano l'espressione delle barriere immunitarie di difesa attivate nell'ospite, la rendono inefficace, creando situazioni di convivenza con l'ospite, da cui estraggono nutrienti per la crescita delle loro popolazioni. La durata della convivenza è variabile, da alcuni giorni (es. batteri nelle maculature) fino a tutta la vita dell'ospite (es. carie del frumento, virus degli alberi da frutto). Gli emibiotrofici si comportano da biotrofici nella fase iniziale dell'infezione, da necrotrofici nella parte terminale (es. peronospora della patata).

Come in medicina umana e veterinaria, il processo infettivo comprende tre fasi: inoculazione, incubazione ed evasione.

L'inoculazione inizia con la penetrazione nell'ospite. Per penetrare i microbi devono superare le barriere tegumentali che la pianta interpone tra sé e l'ambiente: più comunemente cuticola e parete dell'epidermide nelle foglie e nei frutti; la penetrazione è attiva quando il

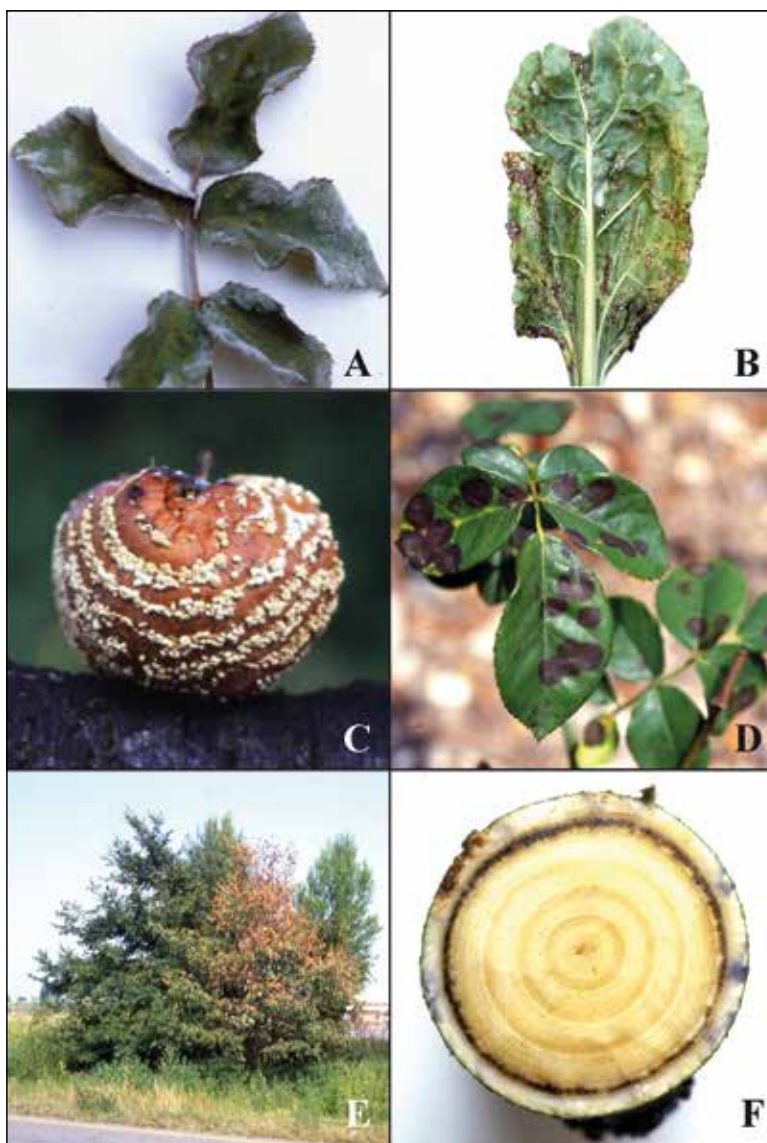


Fig. 9 – Sintomi di micosi di interesse agrario e ambientale. A: Oidio o mal bianco da *Sphaerotheca pannosa* (ascomicete) su foglia di rosa. Il lembo deformato pare incipriato. B: Macchietatura da *Cercospora beticola* (ascomicete) su foglia di barbabietola. La necrosi attorno alle lesioni è causata da una tossina del fungo attivata dalla luce solare. C: Muffa a circoli da *Monilia fructigena* (ascomicete) su mela resa marcescente dall'infezione del fungo necrotrofico. Dalla osservazione delle “nubi” di propaguli liberate da mele (e da acini d'uva) ammuffite Fracastoro nel 1546 intuì il ruolo dei propaguli dei patogeni (seminaria) per il contagio nelle malattie infettive dell'uomo. D: Macchie nere da *Diplocarpon rosae* (ascomicete) su foglie di rosa. E, F: Grafiosi dell'olmo da *Ophiostoma ulmi* (ascomicete). Avvizzimento di una intera branca su albero (E). Annerimento dell'alburno in sezione di branca (F) a seguito di infezione vascolare del fungo.

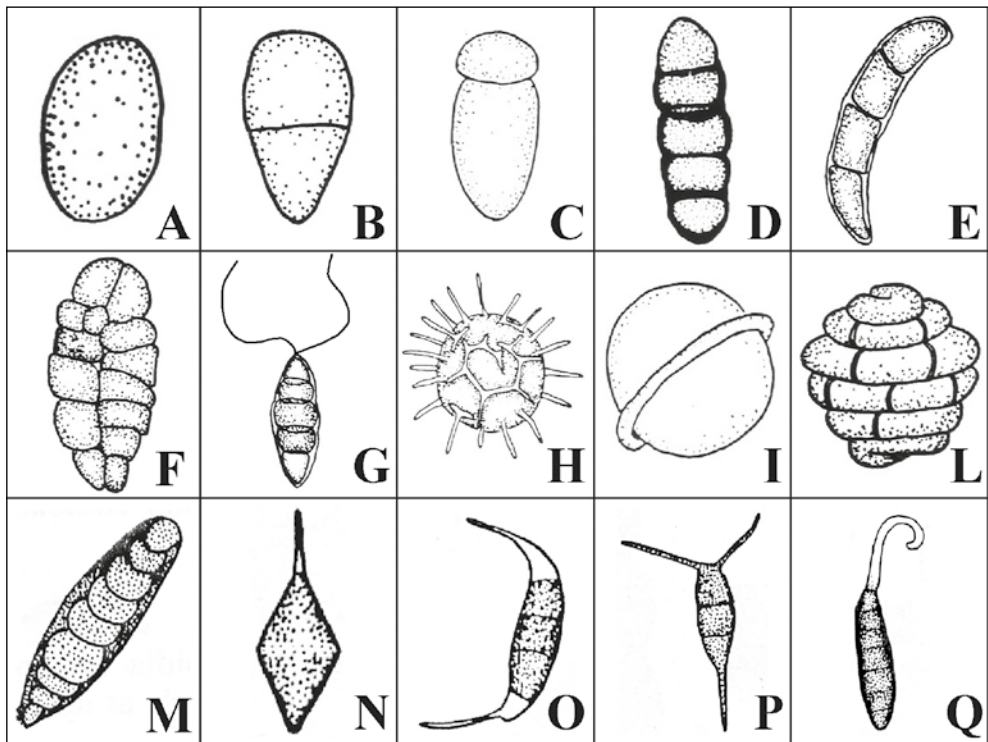


Fig. 10 – Forme di propaguli fungini atti alla disseminazione. Si notino in particolare le ascospore bicellulari di *Venturia inaequalis* (C), il conidio tetracellulare arcuato di *Fusarium* (E), il conidio a due appendici di *Pestalotia* (G), la teliospora di *Ustilago* (H), il conidio di *Bipolaris* (M).

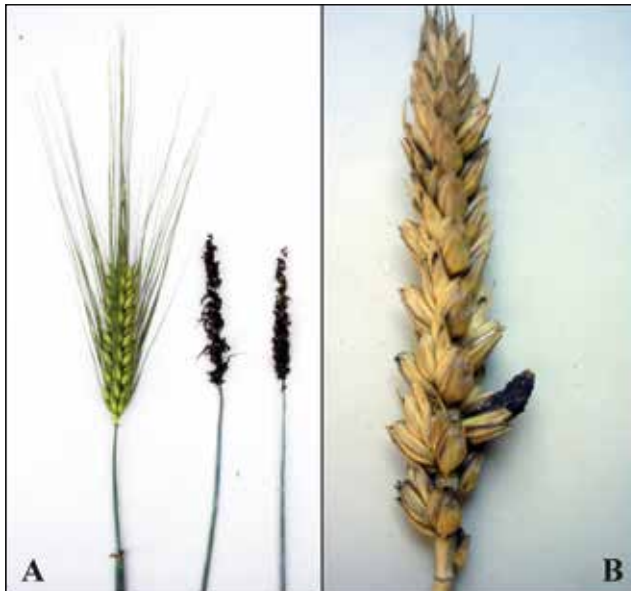


Fig. 11 – Micosi su spighe di cereali. A: Degenerazione e annerimento da carbone volante *Ustilago nuda* (basidiomicete) di due spighe di orzo. B: Spiga “cornuta” di frumento da *Claviceps purpurea* (ascomicete). Lo sclerozio nerastro, ricco di alcaloidi, sporgente dalla spiga, macinato insieme alle cariossidi generava farine “nere”, causa di intossicazioni collettive nelle popolazioni (ergotismo).

microbo esprime propri strumenti di aggressione chimici e/o fisici per il superamento; è passiva quando ha luogo in punti dove le barriere tegumentali sono assenti anatomicamente (es. pori di stomi, idatodi, nettari) od occasionalmente (es. micro- e macro-ferite) oppure quando c'è un vettore, più spesso un fitofago (es. insetto, nematode, acaro, fungo, plasmodioforomicete) che introduce il microbo nell'ospite durante l'attività trofica.

L'infezione da viroidi e fitovirus

La penetrazione di certi virus assai infettivi e ad alta concentrazione nei tessuti dell'ospite (es. virus del mosaico del tabacco, TMV) può aver luogo direttamente attraverso microferite della superficie degli organi. Sperimentalmente, sfregando con un dito bagnato con succo cellulare contenente virioni TMV la superficie di una foglia ricoperta in precedenza con polvere abrasiva (es. carborundum) è possibile inoculare il virus; attraverso impercettibili screpolature della cuticola le particelle virali, messe in contatto con la membrana citoplasmatica delle cellule epidermiche, sono introdotte per endocitosi nel citoplasma.

Nel caso di fitovirus si è visto come la penetrazione sia passiva per mezzo di vettori con trasmissione non persistente, semi-persistente e persistente. La trasmissione non-persistente è attuata dagli afidi durante punture di assaggio di 10-20 secondi su foglie, germogli e frutti, in cui l'insetto conficca gli stiletti nel citoplasma delle cellule epidermiche dopo aver perforato con abbondante salivazione cuticola e parete e poi li ritira, lasciando intatta la membrana citoplasmatica. I virioni sono adsorbiti reversibilmente lungo il canale comune apicale dove confluiscono (dotto salivare e canale di suzione); è opinione corrente che siano introdotti nell'ospite durante l'emissione della saliva (o con rigurgiti), introdotti nel vettore durante la suzione del succo cellulare. La trasmissione semi-persistente è attuata da vettori aventi nutrizione nel floema, raggiungibile solo dopo aver superato parecchi strati di cellule. L'inoculazione richiede pertanto un periodo di suzione di almeno 15-30 secondi. I virioni sono immessi nell'ospite per mezzo di rigurgiti di fluidi digestivi all'inizio della nutrizione, traslocati dai tratti anteriori del canale digerente (fino alla faringe) dove sono adsorbiti. Nella trasmissione persistente i virioni sono introdotti nell'ospite durante l'emissione della saliva proveniente dalle ghiandole salivari dove si sono accumulati a seguito della loro circolazione e/o propagazione all'interno dell'insetto.

Nei diversi tipi di trasmissione hanno un ruolo essenziale proteine esposte alla superficie dei virioni, che condizionano il loro adsorbimento reversibile alla superficie dei siti degli stiletti o del canale alimentare o il passaggio attraverso la parete del tubo digerente e il movimento all'interno del vettore.

La patogenesi delle infezioni virali è assai complessa in funzione della struttura del virus e della strategia di espressione del suo genoma. Il modello più semplice è quello dei virus a singola catena di RNA infettiva (+) (es. TMV), descritto sinteticamente di seguito. Nella cellula il contatto tra i virioni e i ribosomi avvia la loro decapsidazione progressiva e la traduzione dei loro geni in proteine virali; tra queste la RNA polimerasi virale catalizza la sintesi di una catena di RNA (-) complementare alla catena +, a cui si associa temporaneamente, formando una lunga doppia catena (*duplex*) detta forma replicativa del virus. Le catene negative via via prodotte fungono da stampo per la sintesi di nuove catene positive identiche a quella originale. Infine le subunità proteiche capsidiali neo-prodotte si assemblano attorno alle singole catene di RNA positivo, riproducendo i virioni completi.

La traslocazione della maggior parte dei virus da una cellula all'altra ha luogo attraverso i plasmodesmi, canalicoli di intercomunicazione con cui si continuano le membrane citoplasmatiche e i reticoli endoplasmatici di due cellule contigue. I plasmodesmi assicurano continuità del simplasso.

Nel modello virale descritto, il passaggio del plasmodesma è un processo endoergonico

(consumo di ATP da parte dell'ospite) attivato da una proteina virale detta proteina di movimento, che è riconosciuta da proteine dell'ospite ancorate all'imbocco del plasmodesma; induce un suo allargamento e rimane associata all'acido nucleico virale durante l'attraversamento. Mentre i movimenti a breve distanza avvengono da cellula a cellula via plasmodesmi, quelli a lunga distanza via tubi cribrosi del floema. Il passaggio da cellula a cellula è un processo lento (es. 1-2 cellule in 2 – 3 ore), la traslocazione via tubi cribrosi è relativamente rapida (es. alcuni cm/ora).

La trasmissione dei viroidi è passiva ed ha luogo per ferita da oggetti o utensili contaminati o per propagazione vegetativa usando organi o parti di organi (es. marze e gemme da innesto) prelevati dall'ospite infetto. È nota per certi viroidi la trasmissione per seme infettato attraverso l'ovulo o il polline. In due casi (TRMVd e PSTVd) è stata dimostrata la trasmissione per mezzo di afidi; il PSTVd, ad esempio, è trasmesso da afidi attraverso il virus dell'accartocciamento fogliare della patata PRLV (*Potato leafroll virus*) entro cui il RNA viroideale rimane incapsidato.

Anche i viroidi come i virus passano da una cellula all'altra attraverso i plasmodesmi con intervento di qualche proteina dell'ospite, mentre la traslocazione a grande distanza (tranne pochi casi) avviene entro i tubi cribrosi associata a loro replicazione nelle cellule compagne intercomunicanti.

Le infezioni da fitoplasmi, spiroplasma e batteri fastidiosi

La penetrazione dei batteri fastidiosi, dei fitoplasmi e degli spiroplasma è passiva ed ha luogo più spesso attraverso microferite causate da fitofagi più o meno specifici durante la loro attività trofica. Il fitofago funge da vettore e in molti casi da ospite secondario nel senso che il microbo patogeno per la pianta vive e trasloca o addirittura si moltiplica al suo interno. Un vettore-tipo possiede un apparato boccale pungente succhiatore (es. afidi, coccidi, aleuroidi, nematodi) con cui perfora la cuticola e l'epidermide inserendo il tratto terminale dell'apparato entro una cellula vegetale vivente epidermica o parenchimatica o di tubo cribroso del floema (es. fitoplasmi), più raramente in un vaso dello xilema (es. *X. fastidiosa* nella vite). La microferita causata dall'introduzione dello stiletto deve esser tale da non compromettere la vitalità della cellula, perché il patogeno da trasmettere è strettamente biotrofico. Il fitofago vettore può avere l'apparato boccale contaminato o trasferire i propaguli del patogeno dal suo interno attraverso l'emissione della saliva contaminata, lubrificante l'azione meccanica di rottura e attraversamento delle pareti vegetali.

L'infezione da batteri tradizionali

I batteri tradizionali hanno penetrazione passiva attraverso i pori degli stomi, idatodi e netteri o spazi intercellulari degli stigmi fiorali. La penetrazione attraverso gli stomi ha luogo quando si crea momentaneamente (bastano pochi minuti) una continuità liquida tra l'acqua di bagnatura alla superficie dell'organo e l'ampio spazio intercellulare che si trova al di sotto dell'apertura stomatica. La penetrazione avviene più spesso all'alba nel corso della stagione vegetativa, quando con terreno caldo-umido la pianta si è reidratata nel corso della notte e si riaprono gli stomi in presenza di bagnatura di rugiada o di pioggia. Le cellule batteriche sospese nel liquido in corrispondenza della apertura stomatica sono aspirate verso l'interno in concomitanza dell'arretramento della colonna di liquido, per effetto della successiva evaporazione. La penetrazione per ferita ha luogo quando l'acqua di rugiada, di pioggia o di irrigazione avente batteri in sospensione contamina una screpolatura microscopica (es. rottura di un pelo alla base) o una lesione da colpo di grandine o un'erosione di fitofago o un'ampia superficie di taglio di potatura; quando l'acqua evapora, i batteri sono trascinati in spazi intercellulari sottostanti con l'arretramento del menisco. Insetti ad apparato boccale mastica-

tore possono inoculare i batteri che lo contaminano (es. larve di piralide del mais su frutti di peperone, ferretti in tuberi di patata). La moltiplicazione all'interno della pianta comporta riempimento degli spazi intercellulari e delle cavità xilematiche di cellule batteriche confettate da materiali extracellulari idrofili, più spesso polisaccaridi. La loro idratazione progressiva comporta aumento di volume e infiltrazione della massa negli spazi intercellulari contigui o nelle cavità ancora disponibili dei vasi o in lacune interne o nelle cavità ipostomatiche. Ha così luogo la progressiva colonizzazione dell'ospite.

La patogenesi delle galle e dei tumori ad eziologia batterica è di particolare interesse. Certi batteri agenti di galle, penetrati per ferita, vivono in lacune intercellulari, con la loro attività alterano il metabolismo dei regolatori di crescita dell'ospite, inducono ipertrofie e iperplasie delle cellule vegetali limitrofe che permangono fino a che è presente il patogeno (es. rogna o tubercoli dell'olivo). Gli agrobatteri tumorigeni, invece, albergano plasmidi contenenti geni oncogeni (T-DNA) che possono essere trasferiti nelle cellule vegetali per mezzo di un sistema di secrezione IV codificato in un gruppo di geni Vir degli stessi plasmidi. Il T-DNA, trasferito entro la cellula vegetale, si integra in uno o più cromosomi e si esprime sotto forma di auxine e citochinine che inducono le cellule a iperplasie e ipertrofie con formazione di tumori visibili (Fig. 12). Le masse tumorali, costituite da cellule geneticamente modificate, continuano ad accrescersi anche in assenza degli agrobatteri tanto da poter essere propagate *in vitro* per decenni in ambiente asettico. Gli agrobatteri tumorigeni sono pertanto solo vettori del vero agente causale, il plasmide portatore dei geni per la trasformazione tumorale, un vero e proprio parassita genetico.

L'infezione da streptomiceti

Lo streptomicete agente della scabbia della patata penetra attivamente attraverso lenticelle, ferite e, nei giovani tuberi, direttamente attraverso il sottile periderma. Lo pseudomicelio cresce tra le cellule o le attraversa e si comporta da necrotrofico. L'ospite reagisce suberificando le pareti di alcuni strati di cellule al di sotto del tessuto già colonizzato. Fratture di questi strati connessi alla crescita volumetrica del giovane tubero consentono allo pseudomicelio di superare la barriera e colonizzare nuovo tessuto, facendo allargare e approfondire un po' alla volta la lesione scabbiosa.

L'infezione da plasmodioforomiceti

Nei plasmodioforomiceti la penetrazione attiva è attuata dalle zoospore. Nel caso dell'ernia del cavolo (*Plasmodiophora brassicae*) dopo un periodo di motilità nei film liquidi degli spazi tra le particelle di terreno, la zoospora primaria (evasa dalla spora durevole) biflagellata si attacca alla sottile parete di un pelo radicale, retrae i flagelli e si incista; al suo interno si crea una cavità tubolare entro cui si forma un corpo ogivale detto spina. La spora incistata germina emettendo una protuberanza che si allarga all'estremità generando un appressorio che aderisce tenacemente alla parete del pelo. La spina evaginata dentro l'appressorio si dispone perpendicolarmente alla parete del pelo e poi la perfora penetrando nella cellula. Immediatamente, in un secondo, tutto il citoplasma e il nucleo del patogeno sono iniettati entro la cellula del pelo attraverso il foro fatto dalla spina. Entro la cellula del pelo il patogeno è contornato da una membrana dell'ospite entro cui permane e a seguito di mitosi dà luogo al plasmodio polinucleato.

Le zoospore secondarie evase dagli zoosporangi del pelo penetrano direttamente nelle giovani radici, indirettamente per ferita nelle radici più vecchie. Entro il tessuto radicale il plasmodio passa da una cellula all'altra perforando le pareti fino a giungere al cambio, da cui può colonizzare altri tessuti verso l'interno o l'esterno. Le cellule alberganti il plasmodio sono distribuite nella galla fino ad occupare non oltre un terzo della massa. Le ipertrofie delle

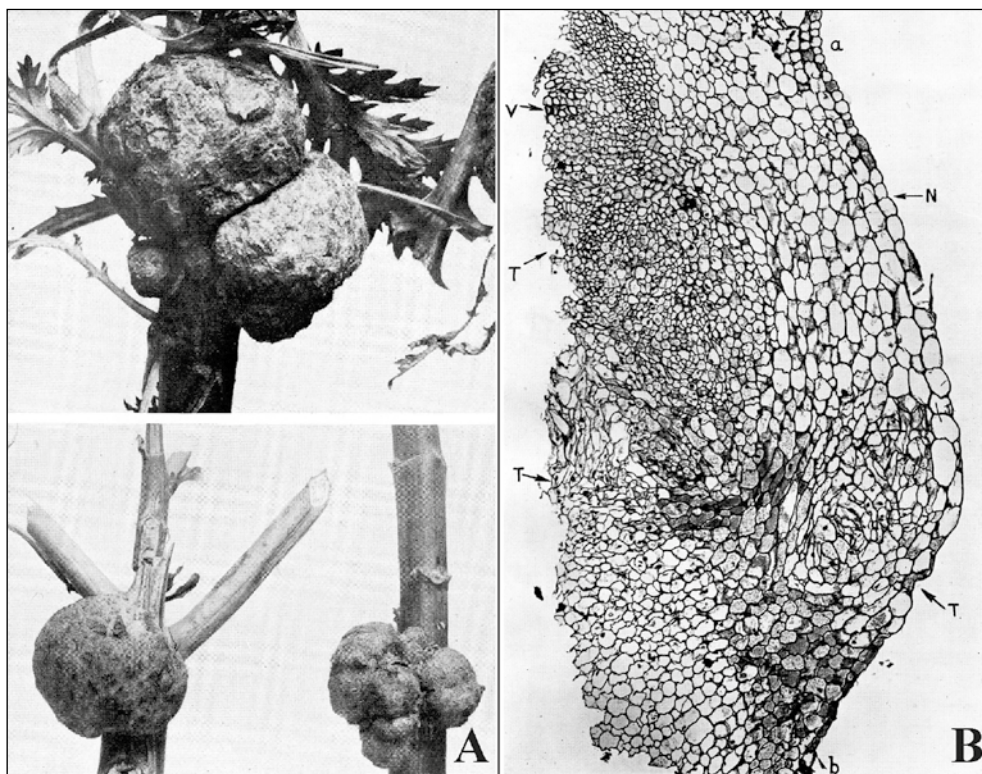


Fig. 12 – Tumori su fusti di *Chrysanthemum frutescens* (margherita) da *Bacterium tumefaciens* (= *Agrobacterium tumefaciens*) (A); sezione istologica della massa tumorale (B), dove si notano ipertrofie e iperplasie delle cellule tumorali (da Smith, Brown e Townsend, 1911). V= fascio vascolare; T= tessuto tumorale; N= Epidermide. In questa monografia si dimostrò per la prima volta con certezza eziologia batterica del tumore vegetale. Prima di Erwin Smith e del suo gruppo negli Stati Uniti solo Cavara in Italia nel 1897 aveva descritto la rogna della vite, ottenuto colture di un batterio e riprodotto sperimentalmente quella forma di tumore. Solo dopo circa 60 anni si identificò come vero agente del tumore un plasmide trasferito dagli agrobatteri virulenti alle cellule vegetali. Le cellule tumorali sono cellule vegetali geneticamente modificate a seguito di integrazione nel genoma di geni trasferiti dal plasmide.

cellule paiono conseguenza di un'alterata omeostasi locale della auxina a seguito della trasformazione della glucobrassicina, metabolita comune alle crucifere, in acido indolacetico per azione dell'enzima glucosinolidasi.

L'infezione da oomiceti e funghi

Gli oomiceti e i funghi si disseminano comunemente per mezzo di propaguli, denominati in generale “spore”, contraddistinte da differenti denominazioni in rapporto alla posizione tassonomica e allo stato gamico o agamico della struttura che li produce (es: zoosporangi, zoospore, conidi, ascospore, basidiospore, etc.) o per mezzo di strutture ifali particolari idonee alla sopravvivenza e alla conservazione nell'ambiente (es. sclerozi, clamidospore, etc.)

Nella penetrazione attiva via appressorio, la spora giunta sull'organo vegetale aderisce alla

superficie e germina, producendo una giovane ifa che si allunga per breve tratto e si rigonfia nella parte terminale formando un appressorio. Saldato tenacemente sulla cuticola lungo il bordo, l'appressorio ispessisce e fortifica la propria parete (depositi di melanina) e si separa con un setto dal tratto di ifa a monte. Per effetto osmotico all'interno dell'appressorio si genera un'elevata pressione positiva e in un punto a contatto con la sottostante cuticola si genera una punta di crescita, che per effetto della pressione e di attività enzimatica la perfora e si allunga attraverso il lume di una cellula epidermica o tra le pareti di due cellule epidermiche contigue. La giovane ifa sviluppa ulteriormente nei tessuti sottostanti e li colonizza in due modi: si allunga entro gli spazi intercellulari e qua e là perfora pareti di cellule ai lati producendo al loro interno un'appendice detta austorio; in altri patogeni la giovane ifa perfora in successione più pareti di cellule, si allunga entro i loro lumi, li attraversa e passa da una cellula all'altra.

In altri funghi il propagulo aderisce alla superficie dell'organo vegetale, germina e sviluppa un'ifa che perfora la cuticola e penetra nella cellula epidermica sottostante, producendo un austorio che rimane in comunicazione con le ife del fungo sviluppate in superficie (es. oidii o mal bianchi) (Fig. 9A).

Nei casi di penetrazione passiva, le spore giunte sull'organo in prossimità di uno stoma o di una ferita, germinano e producono un'ifa che si allunga, attraversa la rima stomatica (o l'apertura del poro) o la screpolatura della ferita e continua il suo sviluppo negli spazi intercellulari del tessuto sottostante. La penetrazione per ferita è comune ai necrotrofici, che colonizzeranno progressivamente i tessuti degenerati per effetto delle tossine e/o degli abbondanti enzimi degradativi secreti per esocitosi.

L'evasione

L'evasione del patogeno dai tessuti infetti dell'ospite, terza fase della patogenesi, può essere attiva o passiva. È attiva quando il patogeno, esprimendo il proprio genoma, si crea stati o produce strutture tali da rendere disponibili i suoi propaguli ai mezzi di disseminazione dell'ambiente. È passiva quando i propaguli sono asportati dai tessuti infetti direttamente da vettori, che li dissemineranno nell'ambiente.

Molti batteri tradizionali evadono sotto forma di goccioline di essudato emergenti in superficie. La massa batterica creata negli spazi intercellulari o nelle cavità lisigene associata ad abbondanti polisaccaridi extracellulari, assorbe acqua in condizioni di alta umidità ambientale e abbondante idratazione dei tessuti vegetali, aumenta il volume e per effetto della pressione interna è spinta all'esterno attraverso stomi o screpolature tissutali. Gli essudati batterici fuoriuscenti da tronchi infetti percolanti verso il basso vanno distinti da flussi degli alberi, spesso conseguenti a gravi processi di carie e degenerazione del cilindro legnoso (Fig. 5B).

Nei plasmodioforomiceti gli sporangi sono espulsi per rottura della parete della cellula epidermica entro cui si sono accumulati in sori. Molti oomiceti e funghi evadono alla superficie degli organi infetti sotto forma di sporangiofori o conidiofori, visibili come muffette di vario colore, oppure sotto forma di goccioline o cirri fuoriuscenti da strutture a fiasco (picnidi) appena emergenti dal tessuto in superficie con il loro collo. Gli sporangiofori e i conidiofori, ife differenziate, singole o ramificate, portano alle loro estremità propaguli monocellulari o pluricellulari, talora di forma bizzarra, attaccati con sottile istmo (es. zoosporangi, conidi) (Fig. 10).

Il distacco dei propaguli ha luogo per rottura dell'istmo causata da *stress* meccanici ambientali (es. scuotimento o oscillazioni di foglie, vento, variazioni brusche dell'umidità relativa), predisposta da azione di enzimi litici di parete attivati localmente dallo stesso patogeno. I conidiofori sulle pareti dei loculi interni dei picnidi producono un'abnorme massa di conidi, che viene spinta all'esterno attraverso l'ostiole del collo.

In fase sessuata molti ascomiceti producono periteci, strutture a fiasco con ostiole del collo

emergente in superficie, aventi nella cavità interna ife basali fertili produttrici di aschi, grosse cellule a sacco, entro cui si differenziano propaguli aploidi detti ascospore. A maturità gli aschi aumentano di volume, si rigonfiano in modo abnorme, si distendono con le loro estremità fino alla bocca dell'ostiolo dove espellono in modo quasi esplosivo le ascospore per rottura della loro parete o per apertura di appositi pori o fessure apicali.

Tra gli ascomiceti, gli oidi vivendo alla superficie di foglie o di giovani frutti non abbisognano di evasione. Dal loro micelio biancastro (mal bianco) sviluppano brevi conidiofori verticali che differenziano apicalmente catenelle di conidi e le aree colonizzate, assimilabili a zone incipriate, assumono un aspetto polverulento (Fig. 9A). Molti basidiomiceti viventi in associazione con alberi evadono dall'ospite, producendo strutture fertili (basidiocarpi) a mensola o a cappello con gambo.

È nota *Armillaria mellea* per la produzione di famigliole di “chiodini” eduli, apprezzati dai buongustai. Sulle pareti dei pori o sulle lamelle di queste strutture si differenziano cellule globose (basidi) portanti in sommità propaguli unicellulari (basidiospore) su sottilissimi istmi; al termine dell'alta umidità della notte, gli istmi si rompono liberando le basidiospore nell'ambiente.

I patogeni a penetrazione passiva (viroidi, fitovirus, fitoplasmi, spiroplasmi, batteri fastidiosi) evadono di regola passivamente, quando i loro vettori si nutrono sugli ospiti infetti aspirando i liquidi di singole cellule o di tessuti conduttori (vasi xilematici, tubi cribrosi).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Agnos G.N., Plant Pathology, Elsevier, Academic Press, 922 pp., 2005.
- 2) Alexopoulos C. J., Mims C.W., Blackwell M., Introductory Mycology, John Wiley & Sons, Inc., 868 pp., 1996.
- 3) Deacon J., Fungal Biology, Blackwell Publishing, 371 pp., 2006.
- 4) Giunchedi L., Gallitelli D., Conti M., Martelli G.P., Elementi di virologia vegetale, Piccin Ed., 333 pp., 2007.

Capitolo 3

I GERMI PERICOLOSI TRASMESSI DAI VEGETALI ALL' ESSERE UMANO E AGLI ANIMALI CON L' ALIMENTAZIONE

CARLO CANTONI

Facoltà di Veterinaria - Università degli Studi di Milano
carloal.cantoni@alice.it

La frutta ed i vegetali in genere possono diventare contaminati da microrganismi in grado di causare malattie nell'uomo e negli animali, sia durante lo sviluppo nei campi o nelle serre, oppure durante la raccolta, il trasporto, la lavorazione, la distribuzione e la vendita.

La figura 1 riporta le vie di contaminazione attraverso cui i microrganismi patogeni possono inquinare i vegetali.

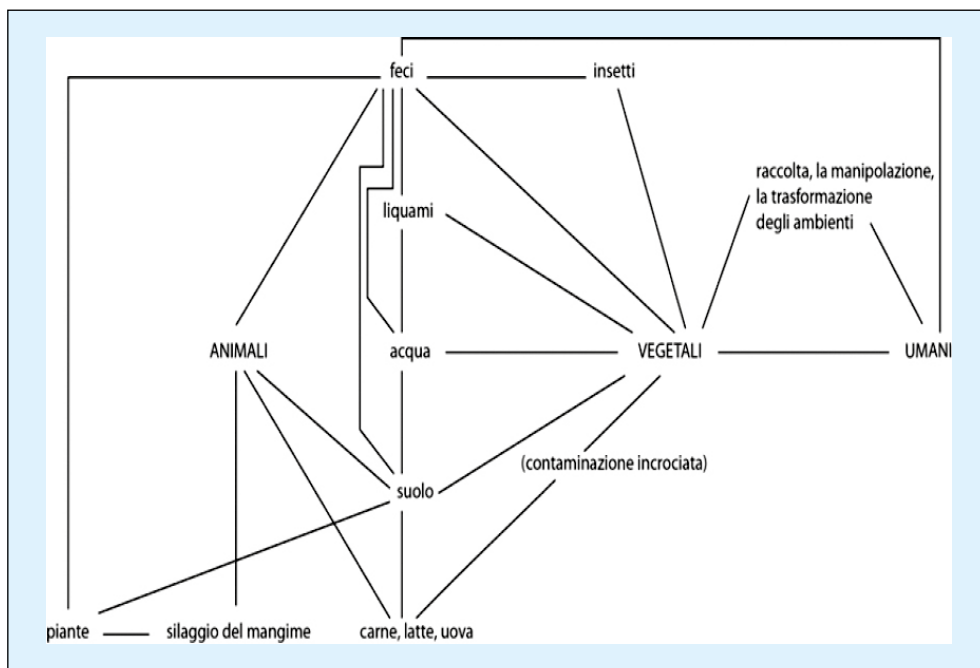


Figura 1 – Vie di contaminazione microbica dei vegetali

Batteri come *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* (tutti capaci di causare malattia), sono normali abitanti di molti terreni, mentre *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* risiedono nell'intestino degli esseri umani ed animali e possono contaminare verdura e frutta mediante il contatto con feci, liquami, acque d'irrigazione inquinate o acque di superficie.

Contaminazioni possono verificarsi, durante e dopo le fasi di trattamento successive, a partire dall'inizio delle lavorazioni, ad esempio nei locali di raccolta e nelle cucine.

Anche virus e parassiti possono risultare inquinanti per il contatto con feci, liquami, acque d'irrigazione.

Numerose ricerche sono state effettuate in molti paesi per determinare la presenza di microrganismi patogeni nei prodotti vegetali. In molte circostanze i batteri patogeni non sono stati individuati; in altre ricerche sono state riscontrate elevate percentuali di positività da batteri in grado di causare malattie.

I risultati di queste ricerche sono elencati nella tabella 1. La lista, ovviamente, non è completa, ma riflette il legame epidemiologico tra consumo di frutta o vegetali crudi e alcune patologie umane (tabella 2).

Diversi fattori possono causare un incremento delle malattie associate al consumo di vegetali crudi. Essi sono rappresentati:

- dall'uso di liquami;
- dall'impropria concimazione (con concimi non maturati) dei terreni in cui vengono coltivati frutta e vegetali;
- da cambiamenti della tecnologia di confezionamento, quali l'impiego di atmosfere modificate o controllate e l'imballaggio sottovuoto;
- dal prolungamento del tempo intercorrente tra raccolta e consumo;
- da mutamenti delle modalità di consumo (per esempio, fuori casa, l'abitudine delle insalate nei locali di ristorazione).

Anche l'aumento degli scambi commerciali ed il trasporto internazionale delle merci in generale potrebbero aumentare il rischio di malattie dovute ai vegetali.

Tabella 1 – Ricerche di batteri provenienti da vegetali crudi. Segnalazioni del primo isolamento (da Beuchat, 2002)

Vegetale	Paese	Patogeno	Prevalenza	Anno
Erba medica	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>		1989
Carciofo	Spagna	<i>Salmonella</i>	3/25 (12%)	1987
Asparago	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>		
Germogli di soia	Malesia	<i>L. monocytogenes</i>	6/7 (85%)	1994
	Malesia	<i>Salmonella</i>	2/10 (20%)	1994
	Svezia	<i>Salmonella</i>		
	Thailandia	<i>Salmonella</i>	30/44 (8,7%)	1994
Foglie di bietola	Spagna	<i>Salmonella</i>	4/52 (7,7%)	1987
Broccoli	Canada	<i>L. monocytogenes</i>	2/15 (13,3%)	1983
	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>		1989
	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>	5/16	198?
Cavoli	Canada	<i>L. monocytogenes</i>	2/92 (2,2%)	1983
	Canada	<i>L. monocytogenes</i>	1/15 (6,7%)	1991
	Messico	<i>E. coli</i> O157:H7	1/13 (25%)	1995
	Perù	<i>V. cholerae</i>		1992
	Arabia Saudita	<i>L. monocytogenes</i>		1993
	Arabia Saudita	<i>Y. enterocolitica</i>		1993
	Spagna	<i>Salmonella</i>	7/41 (17,1%)	1987
	Stati Uniti	<i>C. botulinum</i>	1/337 (0,3%)	1996
	Stati Uniti	<i>L. monocytogenes</i>	1/92 (1,1%)	1989
Carote	Libano	<i>Staphylococcus</i>	(14,3%)	1983
	Arabia Saudita	<i>L. monocytogenes</i>		1993
	Arabia Saudita	<i>Y. enterocolitica</i>		
Cavolfiore	Olanda	<i>Salmonella</i>	1/13 (7,7%)	1978
	Spagna	<i>Salmonella</i>	1/23 (4,5%)	1987
	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>		1989
Sedano	Messico	<i>E. coli</i> O157:H7	6/34 (17,6%)	1995
	Spagna	<i>Salmonella</i>	2/26 (7,7%)	1987

Vegetale	Paese	Patogeno	Prevalenza	Anno
Chili	Surinam	<i>Salmonella</i>	5/16 (31,3%)	1978
Coriandolo	Messico	<i>E. coli</i> O157:H7	2/10 (20%)	1995
Germogli di crescione	Stati Uniti	<i>B. cereus</i>		1976
Cetriolo	Malesia	<i>L. monocytogenes</i>	4/5 (80%)	1986
	Pakistan	<i>L. monocytogenes</i>	1/15 (6,7%)	1992
	Arabia Saudita	<i>L. monocytogenes</i>		1993
	Arabia Saudita	<i>Y. enterocolitica</i>		1993
Indivia	Olanda	<i>Salmonella</i>	2/26 (7,7%)	1978
Finocchio	Italia	<i>Salmonella</i>	4/89 (7,1%)	1976
Cipolla verde	Canada	<i>Campylobacter</i>	2/67 (3,1%)	1992
Foglie di vegetali	Malesia	<i>Salmonella</i>	1/24 (4%)	1995
	Malesia	<i>L. monocytogenes</i>	5/22 (22,7%)	1996
Porri	Spagna	<i>L. monocytogenes</i>	1/5 (20%)	1992
Lattuga	Italia	<i>Salmonella</i>	82/120 (68%)	1976
	Canada	<i>Campylobacter</i>	2/67 (3,1%)	1992
	Canada	<i>L. monocytogenes</i>	3/15 (20%)	1992
	Libano	<i>Staphylococcus</i>	? (14,3%)	1983
	Olanda	<i>Salmonella</i>	2/28 (7,1%)	1978
	Arabia Saudita	<i>L. monocytogenes</i>		1993
	Arabia Saudita	<i>Y. enterocolitica</i>		1993
	Spagna	<i>Salmonella</i>		1987
	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>		1985
Funghi	Stati Uniti	<i>C. jejuni</i>	3/200 (1,5%)	1986
Crescione	Regno Unito	<i>Salmonella</i>		1990
Germogli di crescione	Stati Uniti	<i>B. cereus</i>		1976
	Canada	<i>Campylobacter</i>	1/42 (2,4%)	1992
Prezzemolo	Egitto	<i>Shigella</i>	2/250 (0,4%)	1990
	Libano	<i>Staphylococcus</i>	(7,7%)	1983
	Spagna	<i>Salmonella</i>	1/23 (4,1%)	1987
Pepe	Canada	<i>L. monocytogenes</i>	1/15 (6,7%)	1992
	Svezia	<i>Salmonella</i>		1989
	Stati Uniti	<i>C. botulinum</i>	1/201 (0,5%)	1996
	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>		1989
Patate	Arabia Saudita	<i>L. monocytogenes</i>		1993
	Arabia Saudita	<i>Y. enterocolitica</i>		1992
	Spagna	<i>L. monocytogenes</i>	2/12 (16,7%)	1992
	Stati Uniti	<i>L. monocytogenes</i>	19/70 (27,1%)	1989
	Stati Uniti	<i>L. monocytogenes</i>	28/132 (21,1%)	1989
	Canada	<i>Campylobacter</i>	1/63 (1,6%)	1992
Insalate pronte	Irlanda del Nord	<i>L. monocytogenes</i>	3/21 (14,3%)	1993
	Regno Unito	<i>L. monocytogenes</i>	4/60 (13,3%)	1988
	Regno Unito	<i>L. monocytogenes</i>		1991
Ravanelli	Libano	<i>Staphylococcus</i>	(6,3%)	1983
	Arabia Saudita	<i>L. monocytogenes</i>		1993
	Arabia Saudita	<i>Y. enterocolitica</i>		1993
	Stati Uniti	<i>L. monocytogenes</i>	25/68 (36,8%)	1989
	Canada	<i>Campylobacter</i>	2/74 (2,7%)	1992
	Stati Uniti	<i>L. monocytogenes</i>	19/132 (14,4%)	1989
Insalate verdi	Egitto	<i>Salmonella</i>	1/250 (0,4%)	1990
	Regno Unito	<i>Staphylococcus aureus</i>	13/256 (5,2%)	1991

Vegetale	Paese	Patogeno	Prevalenza	Anno
Insalate vegetali	Canada	<i>L. monocytogenes</i>	6/15 (40%)	1997
	Egitto	<i>Shigella</i>	3/250 (1,2%)	1990
	Egitto	<i>S. aureus</i>	3/36 (8,3%)	1990
	Spagna	<i>Aeromonas</i>	2/33 (6,1%)	1996
	Spagna	<i>L. monocytogenes</i>	21/70 (30%)	1996
	Stati Uniti	<i>Staphylococcus</i>	263	1975
	Germania	<i>L. monocytogenes</i>	(23,%)	1992
	Irlanda del Nord	<i>L. monocytogenes</i>	4/16 (25%)	1993
	Stati Uniti	<i>C. botulinum</i>	2/82 (2,4%)	1996
	Regno Unito	<i>Y. enterocolitica</i>		1987
Germogli di soia	Stati Uniti	<i>B. cereus</i>	56/98 (57%)	1976
Spinaci	Canada	<i>Campylobacter</i>		1992
	Spagna	<i>Salmonella</i>	2/60 (3,3%)	1987
	Stati Uniti	<i>Aeromonas</i>	2/38 (5,2%)	1989
Pomodori	Pakistan	<i>L. monocytogenes</i>	2/15 (13,3%)	1992
Vegetali vari	Egitto	<i>Salmonella</i>	2/250 (0,8%)	1990
	Francia	<i>Y. enterocolitica</i>	4/58 (7%)	1985
	Farnicia	<i>Y. enterocolitica</i>	15/30 (50%)	1985
	Iraq	<i>Salmonella</i>	3/43 (7%)	1979
	Italia	<i>L. monocytogenes</i>	7/102 (6,9%)	1999
	Italia	<i>Y. enterocolitica</i>	1/102 (1%)	1990
	Spagna	<i>L. monocytogenes</i>	8/103 (7,8%)	1992
	Spagna	<i>Salmonella</i>	46/849 (5,4%)	1987
	Taiwan	<i>L. monocytogenes</i>	6/49 (12,2%)	1990
	Regno Unito	<i>L. monocytogenes</i>	4/64 (6,2%)	1994
	Stati Uniti	<i>Salmonella</i>	4/50 (8%)	1994

Tabella 2 - Esempi di patogeni riscontrati in frutta e vegetali coinvolti in episodi di malattie alimentari

Agente	Alimento sospetto o responsabile
<i>Bacillus cereus</i>	germogli
<i>Campylobacter</i>	cetrioli
<i>Campylobacter jejuni</i>	lattughe
<i>Clostridium botulinum</i>	insalate vegetali, cavoli
<i>Escherichia coli</i> Shiga-tossigeni (O157 e O104)	lattughe, spinaci, carciofi, succhi di frutta, insalate
<i>Listeria monocytogenes</i>	cavoli, lattughe, cavolfiori
<i>Salmonella enterica</i>	lattughe, cavoli, cavolfiori, spezie fresche, coriandolo
<i>Shigella sonnei</i>	lattughe, prezzemolo
<i>Staphylococcus aureus</i>	vegetali in foglie
<i>Vibrio cholerae</i>	cavoli e prodotti di orticoltura
<i>Yersinia enterocolitica</i>	lattuga, cetrioli

Tabella 2 bis - Germi patogeni riscontrati in vegetali dall'anno 2000 al 2011

2000	<i>S. enteritidis</i> succo di frutta non pastor.
	<i>S. poona</i> lattuga
	<i>S. typhimurium</i> lattuga
	<i>S. typhimurium</i> lattuga
	<i>S. typhimurium</i> lattuga
	<i>S. typhimurium</i> PT 104 lattuga
	<i>S. typhimurium</i> 2048 lattuga
2001	<i>S. kottbus</i> germogli di erba medica
	<i>S. enteritidis</i> germogli di fagioli <i>Mung</i>
	<i>S. javiana</i> pomodori
	<i>S. newport</i> pomodori
	<i>S. virchow</i> lattuga
	<i>S. poona</i> melone
	<i>S. enteritidis</i> germogli di fagioli
2002	<i>S. javiana</i> pomodori
	<i>S. poona</i> melone
2003-2004	<i>S. enteritidis</i> lattuga
	<i>S. newport</i> lattuga
	<i>S. thompson</i> lattuga
	<i>S. braenderup</i> pomodori
2005	<i>S. typhimurium</i> DT104 lattuga spagnola
	<i>S. typhimurium</i> DT 104 lattuga
	<i>S. enteritidis</i> germogli di fagioli
2006	<i>S. typhimurium</i> pomodori
	<i>S. newport</i> germogli di fagioli
	<i>S. typhimurium</i> pomodori
	<i>S. senftenberg</i> basilico
Altri microrganismi patogeni:	
2003	<i>E. coli</i> O157:H7 cetrioli
	<i>E. coli</i> O157:H7 lattuga
	<i>E. coli</i> O157:H7 lattuga
2006	<i>E. coli</i> O157:H7 lattuga
	<i>E. coli</i> O157:H7 spinaci

(Lofdar *e Coll.*, 2009; Jensen *e Coll.*, 2009; Guzman-Henandez *e Coll.*, 2011; Pigeon *e Coll.*, 2011; Jalava *e Coll.*, 2011; Brownung *e Coll.*, 2011; Olamat A.N. *e Coll.*, 2012)

Negli anni dal 1990 al 1996 è stata segnalata la presenza di *Campylobacter jejuni* in lattughe, patate dolci, cetrioli, succhi di arancia (Heaton *e Coll.*, 2001).

2009	<i>Shigella sonnei</i> <i>Shigella dysenteriae</i>	piselli dolci biscotti
2010	<i>E. coli</i> O145 <i>Salmonella</i> <i>L. monocytogenes</i>	lattuga germogli di erba medica sedano
2011	<i>Shigella sonnei</i> <i>E. coli</i> O104:H4 <i>Cl. botulinum</i> <i>Cl. botulinum</i> <i>Cl. botulinum</i> <i>Salmonella</i> <i>Salmonella</i> <i>E. coli</i> O157: H7 <i>E. coli</i> O157: H7	basilico germogli (Germania, Spagna, Inghilterra) pasta di olive olive in conserva salsa <i>korma</i> germogli di vari vegetali melone fragole lattuga

Tabella 3 - Paesi che hanno segnalato episodi tossinfettivi da vegetali a partire dal 1996 fino al 2006

Australia	25
Brasile	17
Canada	12
Danimarca	1
Francia	4
Germania	2
Norvegia	1
Nuova Zelanda	13
Svezia	23
Scozia	1
USA	98

Casi di tossinfezioni da *Escherichia coli* O104:H4 ETEC, presenti in miscele di semi germogliati provenienti dall'Egitto, sono stati registrati in Germania (3.874 casi), Francia (7 casi), Inghilterra (17 casi) nel 2011.

Tabella 4 - Riassunto dei germi patogeni isolati da vegetali e da succhi

Patogeno	Prodotto
<i>Aeromonas</i>	erba medica, germogli, asparagi, broccoli, cavolfiori, sedani, lattughe, pepe, spinaci
<i>Bacillus cereus</i>	erba medica, germogli, germogli di crescione, germogli di senape, germogli di soia, cetrioli
<i>Campylobacter jejuni</i>	cipolle verdi, lattughe, funghi, patate, prezzemolo, pepe, spinaci
<i>Clostridium botulinum</i>	cavoli, funghi, pepe
<i>E. coli</i> O157:H7 <i>E. coli</i> O104: H4	germogli di soia, succo di mele, cavoli, sedani, coriandolo, germogli di crescione, lattughe
<i>Listeria monocytogenes</i>	germogli di fagioli, cavoli, cicoria, cetrioli, lattughe, funghi, patate, radicchio, insalate vegetali, pomodori

Patogeno	Prodotto
<i>Salmonella</i>	cavoli, meloni, cavolfiori, chili, coriandolo, melanzane, indivia, finocchi, cipolle verdi, lattughe, germogli di crescione, succhi di arancia, prezzemolo, pepe, insalate verdi, spinaci, fragole, pomodori, angurie
<i>Shigella</i>	sedani, meloni, lattughe, prezzemolo, germogli di cipolle, radicchio
<i>Staphylococcus</i>	germogli di erba medica, cardo, lattughe, germogli di cipolla, prezzemolo, radicchio
<i>Vibrio cholerae</i>	cavoli, latte di cocco, lattughe

(da Buck *e Coll.*, 2003)

FONTI DI CONTAMINAZIONE DEI VEGETALI

I patogeni alimentari possono colonizzare e proliferare sugli alimenti vegetali mediante diversi meccanismi:

a) mobilità del patogeno; b) cuticola cerea dei vegetali; c) percolazione dei nutrienti dalle piante; d) adesione.

I batteri permangono sulle superfici formando *biofilm*.

Numerosi studi sono stati effettuati per individuare le fonti di contaminazione dei prodotti agricoli durante le varie fasi di *pre-raccolta* (sul campo) e di *post-raccolta*.

Durante la prima fase, la popolazione batterica può localizzarsi sui vegetali in crescita. Il rischio può amplificarsi dopo la raccolta, sia per ulteriore contaminazione diretta, sia per la moltiplicazione dei patogeni durante le fasi successive di lavorazione e di manipolazione.

L'acqua può essere un'importante fonte di contaminazione nei campi durante la coltivazione. Possibili inquinanti sono le acque libere, provenienti da terreni adibiti a pascolo, per la presenza di feci di animali pascolanti, oppure l'acqua contaminata impiegata per irrigare i raccolti.

Il rischio associato all'uso di acque provenienti da varie fonti è ben noto ed è indispensabile conoscere lo stato microbiologico delle acque usate per irrigare.

Studi approfonditi hanno dimostrato la mancata penetrazione di *E. coli* O157:H7 nelle piante di spinaci coltivate in suoli contaminati dal microrganismo stesso.

Per contro, il contatto e la successiva internalizzazione del germe si sono verificati dopo che le foglie della pianta di spinacio erano state bagnate con acqua contaminata (Mitra *e Coll.*, 2009).

L'irrigazione, comunque, non è la sola via conosciuta di contaminazione, perché anche l'impiego di acqua nelle successive fasi di lavorazione *post-raccolta* può avere un certo peso. Ad esempio, si cita l'episodio d'infezione da *Salmonella newport*, dovuto al consumo di mango trattato con acqua tiepida per impedire l'importazione di moscerini (Sivapalasingame *e Coll.*, 2003).

I patogeni possono essere trasferiti nell'ambiente in seguito a concimazioni con concime non maturato o con liquami contaminati (Natwig *e Coll.*, 1995; Beuchat *e Coll.*, 1997; Ackers *e Coll.*, 1998; Roever, 1998).

Negli Stati Uniti, un'indagine su un episodio di *E. coli* O157 ha permesso di stabilire la vera fonte della contaminazione di spinaci confezionati, individuando ceppi di *E. coli* identici a quelli presenti nelle feci di suini e bovini usate per la concimazione (Jay *e Coll.*, 2007).

Gli insetti possono essere una fonte di contaminazione, perché mosche contaminate direttamente hanno dimostrato di trasferire i batteri alle foglie delle piante ed ai frutti (Iwasa *e Coll.*, 1999; Seia *e Coll.*, 2005; Talley *e Coll.*, 2009). Studi hanno dimostrato la capacità delle mosche a contaminare le foglie con *E. coli* O157:H7 (Iwasa *e Coll.*, 1999). Un gran numero di mosche appartiene alle famiglie delle *Muscidae* e delle *Calliphoridae*, presenti nelle coltivazioni vicine ad allevamenti di bovini portatori di *E. coli* O157:H7 (Tailey *e Coll.*, 2009).

Altre fonti di contaminazione di frutta, usata per la produzione di succhi, comprendono frutta ammassata (caduta a terra, a contatto con suolo, acqua, liquami o letame), acqua contaminata per il lavaggio o per la lavorazione della frutta e, infine, l'inquinamento al momento del consumo (Vojdant *e Coll.*, 2008).

Le modalità di lavorazione, dalla conservazione fino al taglio, sono anch'esse possibili fonti di contaminazione (Wachtel *e Coll.*, 2002). Le superfici di taglio delle foglie rappresentano un bersaglio specifico per i batteri patogeni come le salmonelle, che hanno un tropismo specifico verso di loro (Kroupitaki *e Coll.*, 2009a).

Lo stesso fenomeno è stato notato su sezioni di meloni tagliati, mantenute a temperatura ambiente (Ukuku *e Coll.*, 2007).

Tabella 5 - Sopravvivenza di patogeni enterici in ambienti naturali

Giorni di sopravvivenza di microrganismi patogeni					
Temperature	Ambienti	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Campylobacter</i> spp.
< 0	acqua	> 91 (> 100)	152 (> 152)	448	12' (14-56)
	letame bovino	> 100 (> 100)	48 (> 152)	10	21 (7)
	suolo	99 (100)	63 (> 84)	10	20 (14-56)
4-8	acqua	> 91 (> 300)	152 (> 152)	448	8120 (12)
	letame bovino	70 (> 100)	48 (84-196)	10	12-21 (7-21)
	suolo	99 (100)	63 (84-196)	10	20 (14)
20-30	Acqua (<i>slurry</i>)	49-84 (84)	45-152 (> 152)	10	< 2 (4)
		27-60 (10-100)	19-60 (13-74)	10	3 (11)
	letame bovino	49-56 (10)	48 (28)	10	3 (7)
	suolo	56 (2)	< 45 (28)	10	10 (7)

(da Leifert *e Coll.*, 2008)

NOTA - I valori privi di parentesi derivano da Guan *e Coll.*, 2003. I valori tra parentesi derivano dall'Ontario Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs, 2005

Tabella 6 - Tempo di sopravvivenza di alcuni germi enteropatogeni nell'ambiente

Microrganismi	Ambiente	Tempo di sopravvivenza (giorni)
<i>E. coli</i> O157:H7	Suolo+letame animale	30
	Letame animale	99
	Liquami, fango	60
	Letame ovino non aereato	>365
	Letame ovino aereato	120
	Liquame non aereato	500
	Liquame aereato	30
<i>Salmonella</i>	Suolo	968
	Suolo+liquame bovino	300
	Suolo+letame animale	30
	Acqua sporca	90
<i>Campylobacter</i>	Suolo+letame animale	30
	Letame+acqua sporca	90
<i>Listeria</i>	Suolo+letame animale	30
	Liquame+acqua sporca	180
	Suolo+fango	56

(da Heaton *e Coll.*, 2008)

BATTERI PATOGENI POTENZIALI ISOLATI IN MANGIMI,
I SINTOMI, E/O LE MALATTIE DA ESSI CAUSATE

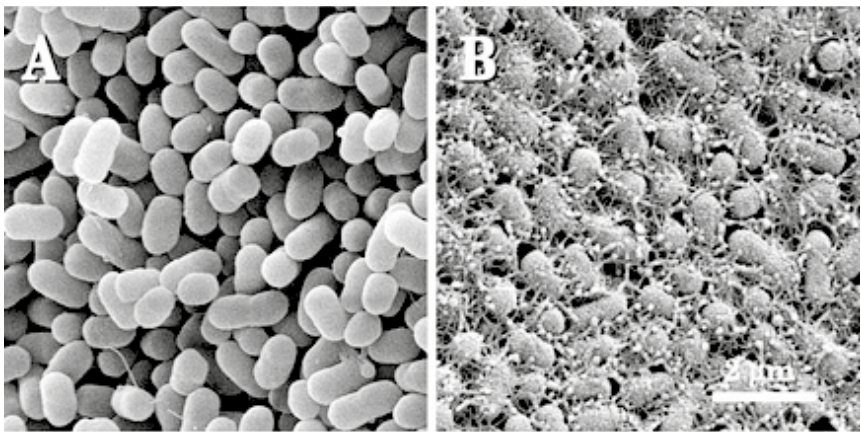
Nella tabella seguente sono elencati i batteri potenzialmente patogeni per gli animali e le malattie da essi provocate.

Tabella 7 - Batteri potenzialmente patogeni isolati da foraggi e mangimi, i sintomi e/o le malattie, le loro cause e note di ecologia

Batterio	Sintomi/malattie	Note
<i>Cl. perfringens</i>	Dilatazione gastrica (primati), enterite necrotica (pollame) e dermatite gangrenosa; enterite, tossiemia (agnelli, pecore), <i>pulpy disease</i> (pecore morte al pascolo)	Può essere un contaminante in vegetali insilati inadeguatamente
<i>Cl. botulinum</i>	Botulismo	Può essere un contaminante di materiale inadeguatamente insilato e conservato. Produce 6 tossine distinte
<i>Listeria</i> spp. (<i>Listeria monocytogenes</i>)	Setticemia, aborto, encefaliti e infezioni oculari	Può essere un contaminante di vegetali inadeguatamente insilati. I ceppi acido-resistenti possono essere presenti in elevato numero in insilati con pH < 4
<i>Escherichia coli</i>	Setticemie, celluliti, aerosacculite (pollame), testa gonfia del pollo (<i>walley head disease</i>)	Può derivare da una fonte dubbia
<i>Salmonella</i> spp.	Enterite, diarrea e setticemia	Può derivare da diverse fonti

MECCANISMI DELL'ADESIONE MICROBICA

L'adesione (attaccamento) è il pre-requisito per la colonizzazione e la successiva trasmissione dei patogeni per mezzo delle parti edibili dei vegetali. Una volta adesi alle superfici, i patogeni non si lasciano distaccare dalla frutta e dai vegetali contaminati mediante il semplice lavaggio (Beuchat e Coll., 2002).



Adesione di *E. coli*

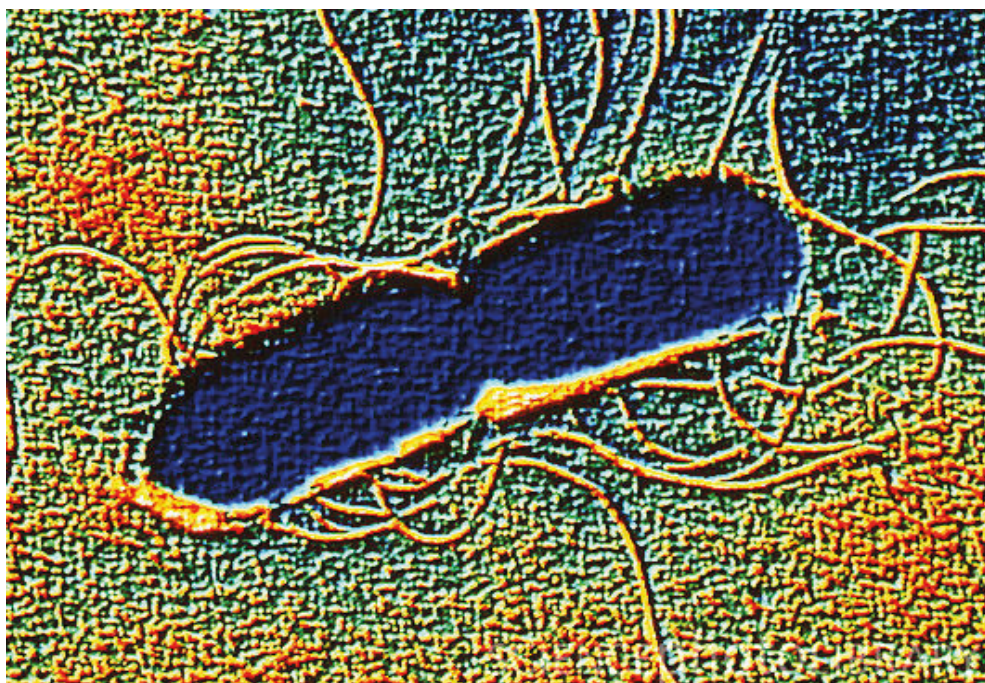
Salmonelle

Le salmonelle sono ubiquitarie in natura e possono essere distribuite sia per via verticale che orizzontale. Esse hanno sviluppato diversi meccanismi per sopravvivere al di fuori della loro nicchia tipica, cioè l'intestino. Il patogeno può utilizzare il cosiddetto SSR o capacità di risposta alla mancanza di nutrienti per resistere a basse concentrazioni di sostanze nutritive.

Le salmonelle possono rispondere a variazioni di pH (ATR o *stationary-phase acid tolerance response*); possono elaborare le catalasi C, in modo da tollerare la presenza di perossidi; sono in grado di evitare i radicali superossidi e di utilizzare un meccanismo (coinvolgente glutammato, ioni K^+ , prolina e trealosio) per mantenere la pressione osmotica (Foster e Coll., 1995). Infine, sono molto resistenti alla disidratazione.

Queste potenzialità rendono le salmonelle capaci di resistere agli *stress* ambientali, così da sopravvivere in molteplici ambienti ed, infine, infettare gli animali.

Negli animali la malattia causata da salmonelle può manifestarsi in tre sindromi principali: setticemia, enterite acuta ed enterite cronica. Alcuni sierotipi di salmonelle, come *S. cholerae-suis* nei suini, *S. dublin* nei bovini e *S. pullorum* nel pollame, possono causare malattie severe; comunque, il bestiame può essere portatore sano di altri sierotipi senza mostrare segni di contagio.



Il genere è composto da due specie: *S. enterica* e *S. bongori* (Su e Coll., 2007).

La specie *Salmonella enterica*, che è la causa principale di gastroenteriti, è suddivisa in centinaia di *serovar* (Lau e Coll., 2009) ed è il patogeno che provoca i casi di tossinfezione legati al consumo di frutta e di vegetali.

S. enterica è divisa in sei sottospecie, ciascuna ordinata in base ai numeri romani e a un nome (I = *S. enterica* subsp. *enterica*, II = *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa = *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb = *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV = *S. enterica* subsp. *houtenae* e VI = *S. enterica* subsp. *indica*).

Le sub-specie di *S. enterica* sono differenziate biochimicamente e in base a rapporti genomici. Si conoscono almeno 2450 sierotipi e la maggior parte di essi fa parte del gruppo *S. enterica* subsp. *enterica* (D'Aoust, 2000).

I serovar di *S. enterica* possono colonizzare i semi (Mahon *e Coll.*, 1997; Wintrop *e Coll.*, 2003), i semi germogliati (O'Mahony *e Coll.*, 1990), le foglie (Campbell *e Coll.*, 2001; Horby *e Coll.*, 2003), la frutta (Mohle-Boctan *e Coll.*, 1999; Guo *e Coll.*, 2001) e una varietà di piante.

L'esame dei vari serovar ha dimostrato che *S. typhimurium*, *S. enteritidis* e *S. senftenberg* aderiscono fortemente ai vegetali in foglia, mentre altre (Arizona, *S. heidelberg* e *S. agona*) non lo fanno (Berger *e Coll.*, 2009a).

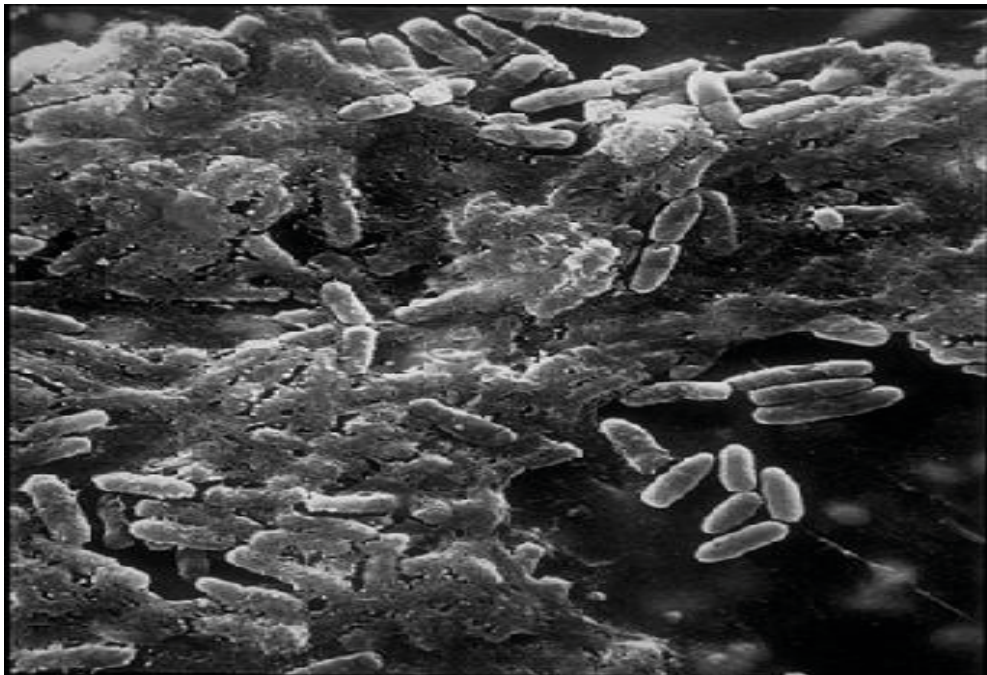
Comunque, le modalità di adesione dei differenti serovar sembrano differenti.

Barak *e Coll.* (2005) hanno segnalato che i *pilus curli* (conosciuti anche come *tafi* e codificati dal gene *agf B*) esercitano un'azione importante nell'adesione di *S. enteritidis* e di *S. newport* ai germogli di erba medica.

Gli stessi ricercatori hanno anche evidenziato che la delezione di *agf B* non impedisce completamente l'adesione delle salmonelle, dimostrando che altre adesine possono esercitare il medesimo effetto (Barak *e Coll.*, 2005).

Altri studi hanno dimostrato che l'antigene capsulare (codificato dal gene *ych O*) e la celluloso-sintetasi (codificata dal gene *bcs A*) possono favorire l'adesione di *S. enteritidis* (Barak *e Coll.*, 2007).

I *pilus curli* (che sono i maggiori componenti proteici della matrice extra-cellulare prodotta dalle *Enterobacteriaceae*), oltre all'adesione alle superfici sono responsabili della formazione di *biofilm* e sono fibre amiloidi.



Biofilm batterici

I ceppi di *Salmonella* formanti *biofilm* consistenti hanno una capacità adesiva e una persistenza maggiori alla superficie esterna di lattuga rispetto ai ceppi di *Salmonella* scarsamente produttori di *biofilm*.

Oltre a queste strutture, anche i flagelli favoriscono la penetrazione di *serovar* nelle piante (Wariner e Coll., 2003; Berger e Coll., 2009a).

Tabella 8 - Seroovar di salmonelle causa di malattie da vegetali contaminati

<i>S. anatum</i>	<i>S. infantis</i>	<i>S. pooma</i>
<i>S. chester</i>	<i>S. java</i> PT Dundee	<i>S. saint-paul</i>
<i>S. cubana</i>	<i>S. javiana</i>	<i>S. stanley</i>
<i>S. enteritidis</i> P14	<i>S. montevideo</i>	<i>S. tennessee</i>
<i>S. harford</i>	<i>S. muenchen</i>	<i>S. typhi</i>
<i>S. havana</i>	<i>S. newport</i>	<i>S. typhimurium</i>

(Fonte: EU (2002), SCF/CE/FHH/SURF/Final)

Escherichia coli

Ceppi di *E. coli* sono normali componenti delle popolazioni batteriche intestinali degli animali e degli esseri umani. Diversi ceppi di *E. coli* possono causare varie sindromi negli animali allevati, come setticemie, sindrome del capo gonfio e aerosacculite.

Alcuni sierotipi di *E. coli* sono causa di celluliti aviarie (Pejghambari e Coll., 1995; Elfadil e Coll., 1996 a,b; Norton, 1997). La cellulite può provocare abrasioni addominali e lesioni.

E. coli è comunemente presente nei foraggi per animali e la concimazione o la contaminazione di feci non trattate possono diventare le vie principali di trasmissione.

***E. coli* diarrogenici**

Tutti gli esseri umani ed animali sono portatori di *E. coli* nell'intestino; essi fanno parte della popolazione batterica naturale e normalmente non sono patogeni. Vi sono però parecchi tipi di *E. coli* che possono causare malattie gastroenteriche nell'uomo. Questi ceppi fanno parte di sei gruppi di patogeni:

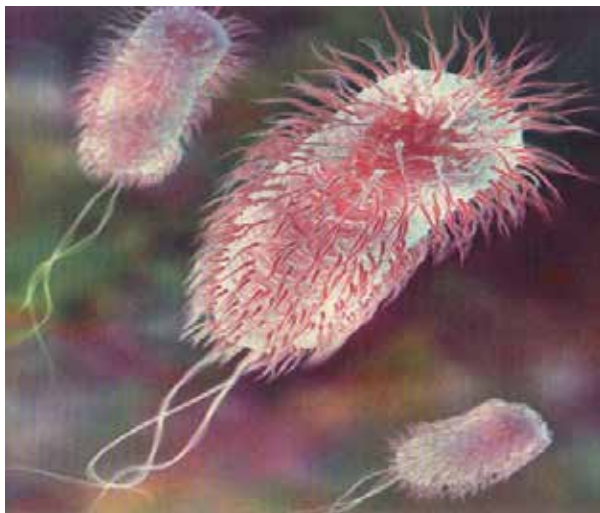
- enteropatogeni *E. coli* (EPEC);
- enterotossigeni *E. coli* (ETEC);
- enteroaderenti *E. coli* (A/EEC);
- enteroinvasivi *E. coli* (E/EC);
- enteroemorragici *E. coli* (EHEC);
- enteroaggregativi *E. coli* (EAgEC).

E. coli è un batterio che molto facilmente e frequentemente scambia informazioni genetiche con batteri correlati, come *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e altri ceppi di *E. coli*, mediante trasmissione orizzontale di geni e quindi i ceppi appartenenti ai gruppi sopracitati hanno acquisito isole di patogenicità che li rendono in grado di riuscire patogeni.

La sindrome uremica-emolitica (HUS) è la malattia sistemica di maggior gravità da essi provocata.

***E. coli* produttori di tossina Shiga**

Questo gruppo di *E. coli* produce tossine molto simili a quella elaborata da *Shigella dysenteriae* tipo 1. Sono stati descritti due tipi di tossine: la tossina *Shiga 1* (STX 1), che differisce



dalla tossina vera per uno dei sette aminoacidi componenti e la tossina *Shiga* 2 (STX 2), che ha una omologia di circa il 60% con la STX 1. Nonostante queste differenze dalla vera tossina *Shiga* (STX), tutti i ceppi STX 1 e STX 2 sono considerati appartenenti alla famiglia delle tossine *Shiga*. Quindi questi batteri sono spesso denominati con l'acronimo STEC, ossia *E. coli* produttori di tossina *Shiga*.

Le tossine *Shiga* sintetizzate da *E. coli* possono causare semplici diarree o forme più severe, fino alla colite emorragica, che può evolvere in sindrome emolitico-uremica (HUS), costituita da anemia emolitica, angiopatia, trombocitopenia e deficienza acuta renale, con conseguente necessità di ricovero ospedaliero. Il responsabile della sindrome HUS è spesso denominato *E. coli* enteroemorragico (EHEC).

I sierogruppi di *E. coli* responsabili di casi di HUS verificatisi in Europa nel periodo 2007-2009 sono i seguenti: O157, O26, O145, O111, O101, O103, O121, O128, O55, O114, O116 (Tessy e Coll., 2011).

La presenza di questi ceppi nei vegetali è stata inferiore all'1% nel periodo 2004-2009, cioè da 0 a 0,7% (Tessy e Coll., 2011). Tuttavia un episodio di notevole gravità è avvenuto nel 2011 in Germania.

I ceppi di *E. coli* produttori di tossina *Shiga* sono patogeni zoonosici, che colonizzano principalmente i bovini e i piccoli ruminanti. Sebbene i prodotti a base di carne bovina siano le fonti più conosciute d'infezione da *E. coli* O157, anche la frutta e i vegetali consumati crudi possono essere veicolo importante d'infezione (Rangel e Coll., 2005).

Per *E. coli* O157 sono state descritte tre modalità. La prima è dovuta all'adesione tenace del germe alla superficie di pomodori, foglie di spinaci e radici di germogli di soia. L'adesione a queste superfici è mediata da *curli* (Jeter e Coll., 2005) e da altre formazioni non conosciute (Jeter e Coll., 2005).

La seconda modalità di adesione di *E. coli* O157, così come quella di ceppi enteropatogeni EPEC, a una varietà di foglie di insalate è mediata dal sistema filamentoso di secrezione di tipo III (T3SS), che è composto da filamenti EspA (Knutton, 1995).

Infine, la terza modalità di adesione è dovuta ai flagelli (Xicohtencare-Cortes e Coll., 2009).

Similmente alle salmonelle, i ceppi *E. coli* O157 possono raggiungere la regione *sub-stomatica* e il mesofillo spongioso, sopravvivendo in questo ambiente (Berger e Coll., 2010).

Caratteristiche del ceppo di *E. coli* STEC O104:H4

Il 26 maggio 2011 in Germania si sono verificati numerosi episodi di sindrome emolitico-uremica (HUS) causata da un ceppo *E. coli* (STEC) produttore di tossina *Shiga*.

Le caratteristiche del ceppo responsabile sono le seguenti:

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">• sorbitolo fermentante• sierotipo O104:H4• tossina <i>Shiga</i> 1: negativo• tossina <i>Shiga</i> 2 (subtipo 2a): positivo• intimina (<i>eae</i>): negativo• enteroemolisina: negativo• Plasmidi di virulenza di <i>E. coli</i> enteroaggregativo:<ul style="list-style-type: none">– aab 4: + positivo– aag R: + positivo– aap: + positivo– aag A: + positivo– aag C: + positivo• sequenza MLS tipo: ST678• ESBL (CTX-M-15): produzione di beta-lattamasi ESBL (CTX-M-15): + positivo; TEM-I: + positivo | <p>Resistenza verso:</p> <ul style="list-style-type: none">– ampicillina– amoxicillina/sulbactam– piperacillina/sulbactam– piperacillina/taxobactam– cefuroxina– cefuroxina-Axetil– cefoxitina– cefotaxime– ceftaxidina– cefpodoxima– streptomina– acido nalidixico– tetraciclina– trimethoprim/sulfametoxazolo |
|--|--|

Questo ceppo possiede un' insolita combinazione fra fattori di virulenza di STEC/VTEC e di *E. coli* enteroaggregativi (EAggEC). Questa associazione è molto rara ed è stata precedentemente trovata in ceppi del sierotipo O111:H2, responsabile di pochi episodi di HUS, verificatisi a danno di bambini in Francia.

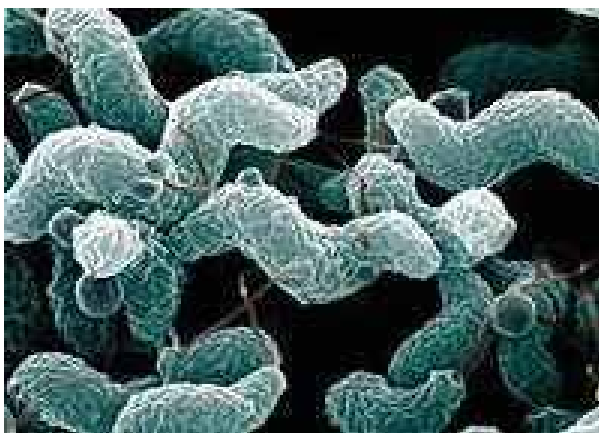
Le infezioni da EAggEC consistono in diarree acquose prolungate a danno di bambini e di viaggiatori nei paesi in via di sviluppo.

L'infezione da *E. coli* O104:H4 ha coinvolto almeno 3874 individui, dei quali 34 hanno perso la vita. La fonte è stata identificata in una miscela di semi di fieno greco, senape, rucola.

BATTERI CONTAMINANTI NON ADERENTI

Campylobacter

Benché l'*habitat* originario di *Campylobacter* spp. sia l'ambiente, la presenza di *Campylobacter* nei campioni ambientali (suolo, acqua, vegetali) può essere intesa come segno di una recente contaminazione fecale. Non solo, i *Campylobacter* sono incapaci di moltiplicarsi al di fuori degli animali a sangue caldo di cui sono



ospiti. Essi, inoltre, sopravvivono per tempi minori rispetto a quelli degli usuali indicatori fecali, cioè coliformi fecali e streptococchi fecali.

I Campylobacter patogeni

Specie di *Campylobacter* segnalate come causa di infezioni gastrointestinali nell'uomo comprendono:

- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter lari*
- *Campylobacter helveticus*
- *Campylobacter upsaliensis*

Specie di *Campylobacter* segnalate come causa di infezioni extra-gastrointestinali nell'uomo comprendono:

- *Campylobacter jejuni*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter fetus*
- *Campylobacter hyointestinalis*
- *Campylobacter sputorum*

Specie di *Campylobacter* segnalate come causa di infezione dentale comprendono:

- *Campylobacter concisus*
- *Campylobacter curvus*
- *Campylobacter rectus*
- *Campylobacter showne*

Gli alimenti pronti per il consumo (RTE), comprese le verdure, possono costituire un rischio per possibili contaminazioni crociate, come evidenziato dalla seguente tabella:

Tabella 9 – Presenze percentuali di *Campylobacter* in vari paesi (%)

1) vegetali, vegetali + frutta, frutta, macedonia	Olanda	0,23
2) vegetali	Malesia	49,51
3) vegetali in MAP (atmosfera modificata)	Regno Unito	22,22
4) vegetali	India	3,57
5) funghi	USA	1,50
6) vegetali	Canada	n.r.
7) vegetali da produttori	Canada	1,69
8) vegetali e frutta	Olanda	0,23
9) vegetali	Irlanda	0,72
10) RTE vegetali	Francia	0,52
11) lattughe	Regno Unito	n.r.

(da Kumar e Coll., 2001)

Campylobacter jejuni è causa sovente di enteriti batteriche in molti paesi. Fonti originarie di questo patogeno sono parecchi animali selvatici e domestici, come il pollame, i bovini, i suini. Il consumo di alimenti di origine animale insufficientemente cotti, come le carni di pollo, infetti da *Campylobacter*, è stato spesso associato con il consumo di frutta e vegetali crudi (Beau e Coll, 1990; Harris e Coll., 1996). Sebbene i *Campylobacter* non crescano

a temperature inferiori a +30°C e siano sensibili a pH acidi, essi possono sopravvivere sulle superfici della frutta tagliata per un tempo sufficiente a costituire un rischio per il consumatore (Castillo e Coll., 1994).

Shigella

La dissenteria bacillare è causata da *Shigella* spp. Si conoscono 4 specie: *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* (Maurelli e Coll., 1997).

La maggior parte delle shigellosi è dovuta alla ingestione di cibi o di acqua contaminati da feci umane.

Le shigelle presenti in esse possono contaminare frutta fresca e vegetali attraverso diverse vie, compresi gli insetti e le mani di persone. Spesso la shigellosi è trasmessa direttamente da persona a persona. Parecchi episodi di shigellosi sono stati attribuiti al consumo di frutta fresca e vegetali. Lattughe, scalogni, insalate vegetali, insalate di patate contenenti cipolle, meloni sono stati veicoli di shigelle (Frelund e Coll., 1987).

Fette di papaya, di jicama e di melone permettono la crescita di *Shigella* spp. (Escartin e Coll., 1989).

S. sonnei permane in foglie di lattuga refrigerate per 3 giorni senza diminuire di numero ed il germe ricomincia a crescere a 22°C (Satchell e Coll., 1990).

Yersinia enterocolitica

Può essere isolata da vari ecosistemi terrestri e dal suolo, dalla vegetazione e dall'acqua di lago e di fiume (Kappend, 1991), ma la maggior parte dei ceppi proveniente da queste fonti non è patogena per l'essere umano. I suini spesso sono portatori di sierotipi in grado di causare malattie nell'uomo. La maggior parte dei ceppi isolati da casi clinici appartiene ai sierotipi 1B/O:8, 2-2/O:5,27, 2-3/O:9 e 3-4 O:3.

La capacità di *Y. enterocolitica* di crescere a temperature di refrigerazione e la sua presenza accertata nei vegetali crudi la fa ritenere un potenziale veicolo di yersiniosi nell'uomo (Catteau e Coll., 1985). In un altro studio di Darbas e Coll. (1985), il 50% dei vegetali analizzati conteneva ceppi non patogeni di *Yersinia*.

Percentuali assai più elevate si riscontrano nelle verdure preparate confezionate. La contaminazione si verifica con la concimazione dei terreni coltivati con feci di animali, soprattutto di suini.

Listeria monocytogenes

Può essere presente nell'intestino di esseri umani e di animali, per cui il microrganismo viene distribuito nell'ambiente esterno con le feci. Il germe è presente in natura come saprofito che cresce nei vegetali in degradazione e quindi la sua presenza nella frutta e nella verdura è frequente.

Indagini su vegetali freschi hanno permesso di constatare la sua presenza in cavoli, cavol-



fiori, patate, radicchio e nelle insalate pronte per il consumo in vari paesi (Heinck *e Coll.*, 1989). Lo stesso è stato visto in pomodori e cetrioli.

Un episodio di listeriosi è stato ben documentato nel 1983 (Schech *e Coll.*).

Listeria monocytogenes cresce alla temperatura di +2°C (Rocourt *e Coll.*, 1992) e può sopravvivere al freddo nei frigoriferi. Può anche crescere su indivia, pomodori, asparagi, broccoli e cavolfiori (Beuchat *e Coll.*, 1990a, 1991, 1986, 1990b; Berrang *e Coll.*, 1989b).

Il rischio di listeriosi aumenta quando questi vegetali sono conservati per lunghi periodi prima del consumo, perché così il germe ha la possibilità di moltiplicarsi.

Attualmente sono conosciuti 13 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4c e 7).

I sintomi di listeriosi variano da infezioni asintomatiche a forme simil-influenzali, setticemie, meningiti, gastroenteriti e aborti.

Listeria spp. sono microrganismi invasivi causa di aborti, encefaliti e setticemie nei ruminanti (Johnson *e Coll.*, 1996). Infezioni oculari sono legate al contatto diretto dell'occhio con *L. monocytogenes* nella movimentazione degli insilati (Nightingale *e Coll.*, 2004).

L. monocytogenes sopravvive in ambienti con bassa concentrazione di ossigeno ed elevata umidità ed è quindi un potenziale patogeno presente negli insilati.

Negli animali le infezioni da *L. monocytogenes* sono conseguenti all'ingestione di insilati insufficientemente fermentati, con pH superiore a 4 (Ryson *e Coll.*, 1997; Woo-Sam, 1999).

La popolazione di *Listeria* negli insilati può essere di 12.000 ufc/g. Anche insilati adeguatamente fermentati possono però permettere la crescita di *listerie* acido-resistenti.

Husu *e Coll.* (1990) e Rysen *e Coll.* (1997) hanno isolato diversi sierotipi di *L. monocytogenes*, incluso un ceppo responsabile di infezione alimentare, da un insilato di mais con pH < 4.

Listeria spp. possono sopravvivere per 10 -12 anni (Woolford, 1990). *L. monocytogenes* ha provocato l'infezione di 1500 persone che avevano consumato mais inscatolato (Aureli *e Coll.*, 2000).

L'epidemiologia della listeriosi può essere complicata anche dallo spargimento di feci di animali portatori sani, come bovini, pecore, capre, suini e pollame.

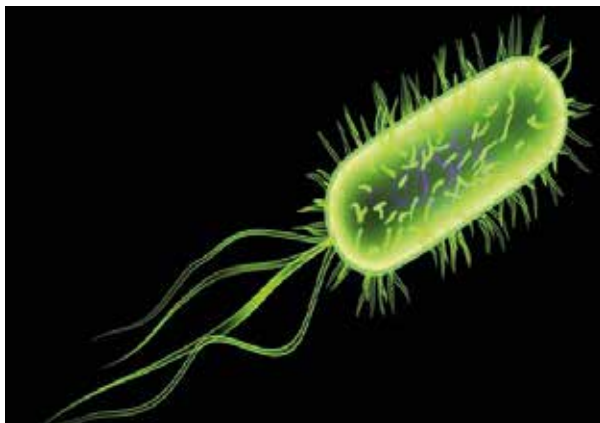
Staphylococcus aureus

È un germe di origine umana e la sua presenza nei vegetali è dovuta alla manipolazione. Lo *S. aureus* enterotossigeno non compete bene con altri microrganismi normalmente presenti su frutta cruda e vegetali, cosicché il processo alterativo causato dalla popolazione batterica non patogena impedisce il suo sviluppo.

***Clostridium* spp.**

Spore di *Clostridium botulinum* e di *Clostridium perfringens* possono essere nel terreno e su frutta e vegetali.

Casi di botulismo sono stati provocati da cavolfiori a base di cavoli porzionati e conservati sotto vuoto (Salomon *e Coll.*, 1990) e da aglio tritato sott'olio (St. Louis *e Coll.*, 1988).



Più di frequente, i due clostridi sono causa di malattie negli animali.

Negli alimenti per animali due clostridi sono di importanza prevalente: *Cl. perfringens* e *Cl. botulinum*.



Cl. perfringens è responsabile di una forma di dilatazione gastrica nei primati e di enterite necrotica nel pollame (Truscott e Coll., 1977; Bennet e Coll., 1980; Annett e Coll., 2002), mentre nei tacchini provoca una dermatite gangrenosa (Carr e Coll., 1996).

Sebbene comunemente isolato dal tratto intestinale, è in realtà un patogeno opportunisto e può causare malattia in seguito ad errori dietetici che disturbano, alterandola, la normale popolazione batterica intestinale.

Le varie enterotossiemie sono dovute a *Cl. perfringens* tipo B negli agnelli e nelle pecore adulte. *Cl. perfringens* tipo C provoca la morte improvvisa negli animali al pascolo.

Sempre nelle pecore, il *Cl. perfringens* tipo D causa la *pulpy kidney disease*, o spappolamento del tessuto renale. Il clostridio può essere presente, oltre che nelle feci degli animali, anche negli insilati.

Il clostridio tipo E causa una malattia infiammatoria dell'intestino (dissenteria) e intossicazione (tossiemia) in vitelli ed agnelli.

I ceppi patogeni producono numerose tossine, quali:

- *Alfa* tossina (A, B, C, D, E) con azione letale, necrotizzante, emolitica e lecitinasica (tipo C);
- *Beta* tossina (B, C) con attività necrotizzante e letale;
- *Gamma* tossina (B,C) letale;
- *Delta* tossina (B,C) con attività letali ed emolitiche;
- *Epsilon* tossina (B,D) con azione letale e necrotizzante;
- *Eta* tossina (A) letale.
- *Teta* tossina (A, B, C, D) emolitica e letale (labile all'ossigeno);
- *Kappa* tossina (A, C, D, E) collagenotica, con conseguenze letali e necrotizzanti;
- *Lambda* tossina (B, D, E) con attività proteinasica;
- μ (mu) tossina (A, B, C) ialuronidasica;
- ν (nu) tossina (A, B, C, D, E) desossiribonucleasica;
- enterotossine (A, B, D) formanti complessi con la membrana cellulare.

Cl. botulinum, essendo un anaerobio obbligato, può trovarsi in insilati, fieni o in pascoli contaminati da spore. L'usuale eziologia del botulismo prevede l'ingestione di tossina formata nell'alimento vegetale. *Cl. botulinum* può colonizzare animali giovani o immunocompromessi.

I ceppi di *Cl. botulinum* possono elaborare una delle otto tossine prodotte (A-F), tre delle quali (B, C, D) sono responsabili del botulismo negli animali (Schoenbaum e Coll., 2000). Ceppi di *Cl. botulinum* (tipo B e C) sono stati isolati da fieni umidi di erba medica, radici umide, da grani e da mangimi misti per polli.

Per la proprietà del germe di permanere nel suolo e nei terreni fertilizzati con letame, questi ambienti possono diventare serbatoi di *Cl. botulinum* nelle fattorie (Notermans, 1981).

Bacillus cereus

Spore di ceppi enterotossigeni di *Bacillus cereus* sono comuni in diversi tipi di terreni. Alcuni ceppi possono crescere alla temperatura di refrigerazione.

Diversi tipi di frutta e di alimenti vegetali, come insalate di riso, soia, mostarda e germogli di crescione sono stati documentati tra i prodotti contaminati da *B. cereus* (Portnoy e Coll., 1976).

L'intossicazione umana è autolimitante ed i suoi sintomi sono diarrea (causata dall' enterotossina) e vomito, dovuto alla tossina emetica.

Ceppi psicrotrofi di *B. cereus*, classificati come *Bacillus weihenstephanensis* crescono a +0,5°C. Il loro tempo di generazione a +7°C è compreso tra 9,4 e 75 ore, ma nel riso bollito, tenuto a +30°C, il tempo di generazione è di 26-57 minuti.

Questi microrganismi possono produrre tossine a basse temperature, ma non tutti i ceppi le producono.

Vibrio spp.

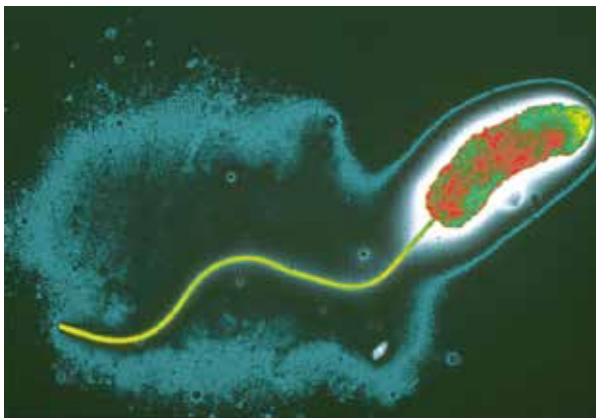
Predominanti nelle acque d'estuario, questi germi si ritrovano in un'ampia varietà di pesci e di molluschi. Vi sono 12 specie di vibrioni patogeni per l'uomo. Tra queste, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* sono quelle di maggior rilevanza.

V. cholerae è l'agente del colera, una delle poche malattie alimentari a potenzialità endemica e pandemica. L'esistenza di portatori infetti è una via importante per la trasmissione della malattia. L'acqua può essere contaminata da acque di scarico contenenti *V.*

cholerae o da vegetali lavati con acqua inquinata, con conseguente diffusione del colera ad altri soggetti, i quali a loro volta diffondono il microrganismo.

V. parahaemolyticus può casualmente essere presente sulle verdure, che diventano a loro volta un veicolo potenziale di trasmissione per l'uomo.

V. vulnificus provoca un' infezione caratterizzata da lesioni epatiche, in seguito al consumo di insalate miste vegetali e prodotti della pesca (bivalvi).



CONCLUSIONI

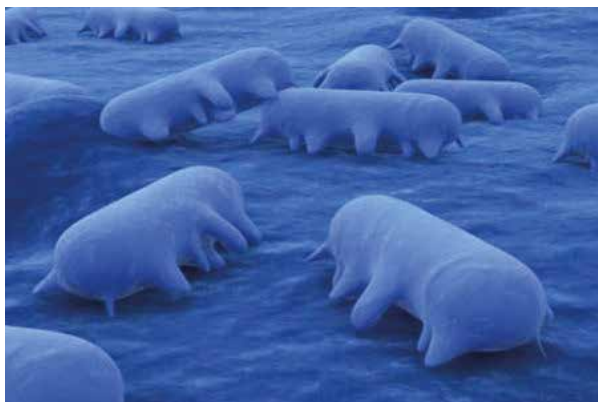
Diversi batteri patogeni, ma anche virus e parassiti, capaci di causare malattie nell'uomo, possono risultare presenti sulla frutta e sui vegetali crudi. Alcuni di questi microrganismi sono in grado di crescere sulla frutta intera o porzionata e sui vegetali in generale nel periodo della coltivazione; altri giungono sull'alimento con le manipolazioni o durante la conservazione. Sono quindi necessari dei trattamenti per prevenire la contaminazione. Se questi falliscono, è indispensabile rimuovere i microrganismi prima del consumo.

L'applicazione delle buone pratiche di lavorazione durante la produzione, il trasporto e la lavorazione, insieme con il sistema HACCP, certamente riduce il rischio di malattie acquisite attraverso questi alimenti, ma può risultare insufficiente.

È necessario allora ricorrere al trattamento con disinfettanti per rimuovere i patogeni. Anche in questo caso si deve tener presente che nessuno dei trattamenti chimici attualmente usati per disinfettare frutta e vegetali crudi può riuscire ad eliminare tutti i tipi di patogeni (virus, batteri, protozoi) presenti sulle superfici o all'interno dei tessuti.

L'efficacia dei vari disinfettanti e dei metodi di sanificazione impiegati per ridurre la popolazione microbica nei vegetali è variabile. Secondo Beuchat (1998) si possono trarre le seguenti conclusioni generali:

- l'efficacia del disinfettante varia secondo i tipi di frutta e verdura per le caratteristiche delle loro superfici, la temperatura e il tipo di patogeno;
- *L. monocytogenes* è più resistente al disinfettante rispetto a salmonelle, *Escherichia coli* O157:H7 e *Shigella* spp. Poco si conosce sull'efficacia dei disinfettanti riguardo l'uccisione di parassiti e di virus presenti in frutta e vegetali;
- il lavaggio di frutta e verdura con acqua potabile rimuove una parte delle cellule microbiche. È necessario usare acqua con almeno 200 ppm di cloro per ottenere una sanificazione efficace;
- la frutta e i vegetali molto sporchi devono essere sottoposti a due o più lavaggi. In proposito, il primo lavaggio deve essere effettuato con acqua potabile ed il successivo (o successivi) con acqua più disinfettante;
- la temperatura dell'acqua di lavaggio dovrebbe essere più elevata rispetto a quella della frutta e dei vegetali;
- l'effetto letale del cloro si verifica in pochi secondi dall'inizio del trattamento. La popolazione microbica decresce con l'aumento della concentrazione di cloro fino a 300 ppm. Al di sopra di tale concentrazione, l'effetto non è proporzionale alla quantità di cloro;
- il lavaggio di frutta e verdura dopo il trattamento con cloro può avere effetti negativi;
- i disinfettanti da usare sono quelli con cloro, bromo, iodio e trisodio-fosfato;
- l'ozonizzazione dell'acqua riduce notevolmente la concentrazione batterica;
- ovviamente feci (o acqua contenente feci) non devono venire a contatto con frutta e verdura;
- la prevenzione della contaminazione da patogeni deve essere effettuata con l'applicazione delle buone pratiche agricole (GAP), delle buone pratiche di lavorazione (GMP) e con un programma specifico di HACCP. Tutto ciò è preferibile all'impiego di disinfettanti e fertilizzanti chimici.



Salmonelle adese alle superfici dell'ospite

BIBLIOGRAFIA

- 1) Achers M.; Mahon B.; Leahy F.; Danrow T.; Hutwagner L.; Barrett T.; Bibb W.; Hayes B.; Griffin P. & Slutsker T. (1996), *76th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, sept. 15-18, p. 258, Washington, D.C., A.M.S.
- 2) Annett C.B.; Viste J.B.; Churino-Trejo M.; Classen H.L.; Middleton D.M. & Simko E. (2000), *Avian Pathol.* 31, 599-602.

- 3) Aureli P.; Fiorucci G.C.; Caroli D.; Marchiaro G.; Novara O.; Leone L. & Salmazo S. (2000), *N. Engl. J. Med.* **342**, 1236-1241.
- 4) Barak J.D.; Gorski L.; Naraghi-Arani P.; Charkowski A.D. (2005), *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5685-5691.
- 5) Bean N.H. & Griffin P.M. (1990), *J. Food Prot.* **53**, 807-814.
- 6) Benang M.E.; Prackett R.F. & Benchat L.R. (1989), *J. Food Prot.* **52**, 702-704.
- 7) Benchat L.R. (1992), *Dairy Food Environ. Sanit.* **12**, 6-9.
- 8) Bennett B.T.; Cuasa L.; Welsh T.S.; Belnan E.Z. & Schofield L. (1980), *Lab. An. Sci.* **30**, 241-244.
- 9) Berger C.N.; Sodha S.V.; Shaw R.K.; Griffin P.M.; Pink D.; Hand P. & Frankel G. (2010), *Environmental microbiology* **12**, 2385-2397.
- 10) Beuchat L.R.; Brackett R.E.; Hao D.Y. & Courrer D.E. (1986), *Can. J. Microbiol.* **21**, 791-795.
- 11) Beuchat L.R. & Brackett R.E. (1990), *J. Food Sci.* **55**, 755-758.
- 12) Beuchat L.R. (1996), *Food Control* **7**, 223-228.
- 13) Beuchat L.R. (1996), *J. Food Protection* **59**, 204-216.
- 14) Beuchat L.R. (1998), *Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw. A Review*, Who/FOJ/98/2.
- 15) Browning L.M.; Premph H.; Little C. et alii (2011) *Eurosurveillance* **16**,49,11.15.
- 16) Buck J.W.; Walcott R. & Benchat L.R. (2003), *Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables*, Progress doc. 10, 1094/PHP, 2003.
- 17) Campbell J.V.; Mohle-Boctani; Reporter M.; Abbott S.; Farrow S.; Brandt M. (2001), *J. Infect. Dis.* **183**, 166-168.
- 18) Carroll D.; Shaw D.; Hahorzan D.A.; Rings B. & Roep (1996), *Avian Dis.* **40**, 736-741.
- 19) Castillo A. & Escartin E.F. (1994), *J. Food Prot.* **57**, 166-168.
- 20) Catteau A.; Krembel & Waters M. (1985), *Sci. Aliments* **5**, 105-106.
- 21) D'Aoust J.Y. (2000), *Salmonella*, p. 1234, in Lund B.M.; Baird Parker A.G. & Gou G.W. (eds.), *The microbial safety and quality of foods*, Aspen publ., Gatesburg M.P.
- 22) Darbas H.; Riviera M. & Obertic J. (1985), *Sci. Aliments* **5**, 81-84.
- 23) Elfadil A.A.; Vaillancourt J.P.; Meek A.H.; Julian R.S. & Gyles C.L. (1996), *Avian Dis.* **40**, 690-698.
- 24) Elfadil A.A.; Vaillancourt J.P.; Meek A.H. & Cyles (1999), *Avian Dis.* **40**, 677-689.
- 25) Escartin E.F.; Castillo Ayala A. & Lozano S. (1989), *J. Food Protec.* **52**, 471-472, 482.
- 26) Foster J.W.; Speck M.T. (1985), *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 145-172.
- 27) Fredlund H.; Back E.; Sjoberg L. & Torquist E. (1987), *Scand. J. Infect. Dis.* **19**, 219-222.
- 28) Frieserna I.; Sigmundsdottir G.; Van der Zwalu W.R.; Heuvelin K. (2008), *Eur. Surveill.* **13**: pil 19095.
- 29) Guan T.Y.; Holley R.A. (2005), *J. Environ. Quality* **32**, 383-392.
- 30) Guo K.; Chen J.; Benchat R.E. & Benchat C.R. (2001), *Appl. Environ. Microbiol.* **94**, 4760-4764.
- 31) Guzman-Hernandez; Vold L.; Cornell H.; Stavnes T.L.; Jensvoll; Lindegard Annstad; Severinsen G.; Aagaard Gri Cudjoe J. & Nygard K. (2011) *Eurosurveillance* **16**, 44,1-5.
- 32) Harris M.V.; Martin S.R. & Ellias L. (1975), *Milk Food Technol.* **36**, 759-774.
- 33) Heaton J.C. ; Jones K. (2008) *J. Appl. Microbiol.* **104**, 613-626.
- 34) Heisick L.E.; Wagher D.L.; Wierman M.L. & Peeler T. (1989), *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1925-1927.
- 35) Horby P.W.; O'Brien S.J.; Adak G.K.; Graham C.; Hawker J.I. & Hunter P. (2003), *Epidemiol. Infect.* **130**, 169-178.
- 36) Husle Iwasa M.; Makino S.; Asakura H.; Kabori H. & Morimoto Y. (1999), *J. Med. Entomol.* **36**, 108-112.

- 37) Jalava K.; Selby K.; Phlajasaari A.; Kohlo E. et alii (2011), *Eurosurveillance* 16, 49, 8-10.
- 38) Jay M.T.; Cooley M.; Carichao D.; Wiscomb G.W.; Swelter R.A.; Crawford-Milksza L. (2007), *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1908-1911.
- 39) Jeter C. & Mathisse A.G. (2005), *Mol. Plant Microb. Interact.* 18, 1235-1242.
- 40) Johnson G.C.; Maddox C.W.; Fales W.H.; Wolff W.A.; Randle R.J.; Schwartz H.; Heise K.M.; Baetz A.L.; Wesley I.V. & Wagner D.E. (1996), *JAVMA* 108, 1695-1699.
- 41) Kapperud G. (1991), *Int. J. Food Microbiol.* 12, 53-69.
- 42) Knutton S. (1995), *Methods Enzimol.* 253, 145-158.
- 43) Krontopiski Y.; Pinto R.; Brandt M.T.; Belausov & Seia S. (2009), *J. Appl. Microbiol.* 106, 1876-1885.
- 44) Kumar A.; Agarwall R.K.; Bhilegaonkar K.N.; Shome B.R.; Bachhil V.N., (2001) *Int.J.Food Microbiol.* 67. 153-155.
- 45) Lan R.; Reeves P.R. & Octavia S. (2009), *Infect. Genet. Evol.* 9, 986-1005.
- 46) Lordahl M; Ivarsson S.; Anderson S.; langmark S. & Plym-Forshell L. (2009), *Eurosurveillance* 16,14 pil 19268.
- 47) Mahon B.E.; Ponka A.; Holl W.N.; Komatsu K.; Dietrich S.E. & Sittanen A. (1997), *J. Infect. Dis.* 175, 876-882.
- 48) Maurelli A.T. & Lampel K.A. (1997), *Shigella species*. In: Doyle M.P.; Benchat L.R.; Montville T.J. (eds.), *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*, pp. 216-227, Washington D.C., AMS.
- 49) Mitra R.; Cueseta Alonso E.; Wagadadude A.; Tailey J.; Gilliland S. & Fletcher J. (2009), *J. Food* 180, 1361-1364.
- 50) Muller L; Jensen T.; Petersen R.F; Melbak K. & Ethelberg S.(2009) *Eurosurveillance* 18,14 pil 19241.
- 51) Natvig E.E.; Ingham S.C.; Ingham N.H.; Coopeiband L.R. & Ropert H. (2002), *Appl. Env. Microb.* 68, 2237-2244.
- 52) Nightingale K.K.; Schukken Y.H.; Nightingale C.R.; Fortes E.D.; Ho A.S.; Her Z.; Grohn Y.T.; McDonough P.L. & Wiedman M. (2004), *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4458-4467.
- 53) Norton R.A. (1997), *Avian Cellulitis World, Poultry Sci. J.* 53, 337-349.
- 54) Notermans S.; Dufrenne J. & Oosterom J. (1981), *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 179-182.
- 55) O'Mahony M.; Cowden J.; Smith B.; Linch D.; Hall M.; Rowe B.; Teare E.L.; Coles A.M.; Gilbert R.J. (1990), *Epidemiology and Infect.* 104, 229-231.
- 56) Olaimar A.N. & Holley R.A. (2012) *Food Microbiol.* 32,1-19.
- 57) Ontario Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs (2003) Factsheet 720/400, Manure Composting as a Pathogen Reduction Strategy, Toronto, Canada, Queen's Printer for Ontario.
- 58) Peighambari S.M.; Vaillancourt J.P.; Wilson R.A. & Giles C.L. (1995), *Avian Dis.* 39, 116-124.
- 59) Pingeon M.; Vanbocstael C.; Popoff M.R. et alii (2011), *Eurosurveillance* 16, 49, 5-8.
- 60) Portnoy B.L.; Goepfeet J.M. & Harmon S.M. (1976), *Am. J. Epidem.* 103, 589-599.
- 61) Rangel J.M.; Sparling P.J.; Crowe C.; Griffin P.M. & Swerdlow D.L. (2005), *Emerg. Infect. Dis.* 11, 603-608.
- 62) Rocourt J. & Cossart P. (1997), in Doyle M.P.; Benchat L.R. & Montville T. (Eds.), *Food microbiology. Fundamentals and Frontiers*, pp. 337-352, Washington D.C., AMS.
- 63) Roever C.D. (1998), *Food Control* 9, 321-347.
- 64) Ryser E.T.; Arimi S.M. & Donnelly (1997), *Appl. Env. Microbiol.* 63, 3698.
- 65) Schoenbaum M.A.; Hall S.M.; Glock R.D.; Grant K.; Jemmy A.L.; Schiefer T.J.; Sciglibaglio P. & Wintlock B.H. (2000), *JAVMA* 217, 365-368.
- 66) Schlech W.F.; Lavigne P.M.; Boston R.A.; Allen A.C.; Haldane E.W. (1983), *N. Engl. J. Med.* 308, 203-206.

- 67) Sela S.; Nestel D.; Pinto R.; Nemy-Lavy E. & Bar-Joseph M. (2005), *Appl. Env. Microbiol.* 71, 4052-4056.
- 68) Sivapalasingam S.; Friedman C.R.; Cohen C. & Tauxe R.V. (2004), *J. Food Prot.* 67, 2342-2353.
- 69) Solomon F.B.; Yaron S. & Matthew R.R. (2002), *Appl. Env. Microbiol.* 68, 397-400.
- 70) Tailey J.L.; Wayadande A.C.; Wasala L.P.; Gerry A.C.; Fleeter J.; De Silva U. & Gilliland (2009), *J. Food Prot.* 72, 1547-1532.
- 71) Truscot R.B.; Al-Sheikhly F. (1977), *Am. J. Vet. Res.* 36, 857-867.
- 72) Ukuku D.O. & Sapers G.M. (2007), *Food Microbiol.* 24, 288-295.
- 73) Vojdani J.D.; Benchat L.R. & Tauxe R.V. (2008), *J. Food Prot.* 71, 356-364.
- 74) Wariner K.; Spaniolas S.; Dickinson N.; Wright C. & Wolters W.M. (2003), *J. Appl. Microbiol.* 95, 719-722.
- 75) Watchel M.R. & Charkosky A.O. (2002), *J. Food Prot.* 65, 485-490.
- 76) Wintrop K.L.; Palumbo M.S.; Farrar J.A.; Mohele-Boetani J.C.; Abbott S. & Beatty M.E. (2003), *J. Food Prot.* 72, 1531-1537.
- 77) Woolford M.K. (1990), *J. Appl. Bacteriol.* 68, 101-116.
- 78) Woo-Sam N.H. (1999), *Can. Vet. J.* 40, 506-508.
- 79) Xicohtencatl-Cortes J.; Blanchet Chacon; Saldana Z.; Freer E. & Giron J.A. (2009), *J. Food Prot.* 72, 1531-1537.

Capitolo 4
**STATISTICHE SULLA FREQUENZA DEI GERMI PATOGENI
 IN ALIMENTI VEGETALI**

RENZO MIONI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Legnaro (Padova)
 rmioni@izsvenezie.it

Top ten degli alimenti causa di outbreaks in USA (dati FDA 1990-2008)

Alimento	n. outbreaks	n. persone coinvolte	causa
1 Verdure in foglia (lattuga, scarola, spinaci,...)	363	13.568	<i>E. coli</i> O157:H7 (10%) <i>Salmonella</i> (64%) <i>Norovirus</i> (10%)
2 Uova	352	11.163	<i>Salmonella</i>
3 Tonno	268	2.341	Sgombro-tossina: miscela di istamina e molecole analoghe
4 Ostriche	132	3.409	<i>Norovirus</i> <i>Vibrio spp.</i>
5 Patate	108	3.659	<i>Salmonella</i> (30%) <i>Shigella</i> <i>Listeria monocytogenes</i>
6 Formaggi	83	2.761	<i>Listeria monocytogenes</i>
7 Gelati	74	2.594	<i>Salmonella</i> Stafilococchi
8 Pomodori	31	3.292	<i>Salmonella</i> <i>Norovirus</i>
9 Germogli	31	2.022	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>Salmonella</i>
10 Bacche	25	3.397	HAV ciclospora

Metodiche analitiche

Microrganismi	Metodo d'analisi di riferimento
<i>Salmonella</i>	ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp. Technical corrigendum 1: 2004
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> . Part 1: Detection method Amendment 1:2004 - Modification of the isolation media and haemolysis test, and inclusion of precision data

Microrganismi	Metodo d'analisi di riferimento
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ISO 10273 : 2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection of presumptive pathogenic <i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>E. coli</i> 0157	ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of <i>Escherichia coli</i> 0:157
<i>Campylobacter</i>	ISO 10272-1:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Campylobacter</i> spp. Part. 1: Detection method

RICERCA CORRENTE IZS VE 17/08

Messa a punto di protocolli biomolecolari e studio delle problematiche microbiologiche associate al consumo di alimenti di origine vegetale “*Ready to eat*”.

Materia prima vegetali: contaminazione primaria

Prodotti	Tot. campioni	Tot. campioni positivi per									
		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Yersinia</i> spp		<i>E. coli</i> O:157		<i>Campylobacter</i> spp.	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I gamma	254	1	(0,39%)	15	(5,91%)	27	(10,63%)	0	(0,00%)	0	(0,00%)
			S. napoli								

		Yersinia enterocolitica							
Prodotti	Yersinia spp	non agglutinante		O:8		O:9		Y. kristensenii	
		n	%	n	%	n	%	n	%
I gamma	27	11	40.74%	14	51.85%	1	3.70%	1	3.70%

Contaminazione residua nelle insalate di IV gamma

Prodotti	Tot. campioni	Tot. campioni positivi per									
		<i>Salmonella</i> spp.		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Yersinia</i> spp		<i>E. coli</i> O:157		<i>Campylobacter</i> spp.	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
IV gamma	120	0	(0,00%)	7	(5,83%)	23	(19,17%)	0	(0,00%)	0	(0,00%)

		Yersinia enterocolitica							
Prodotti	Yersinia spp	non agglutinante		O:8		O:9		Y. kristensenii	
		n	%	n	%	n	%	n	%
IV gamma	23	11	47.83%	11	47.83%	0	0.00%	1	4.35%

Capitolo 5 **COSA RACCOMANDANO GLI ESPERTI DI ALIMENTAZIONE**

BARBARA RIPAMONTI¹, MARIA ADA MARZANO², CLAUDIA MARIA BALZARETTI³

¹ Biologo nutrizionista libero professionista
barbara.ripamonti@guest.unimi.it

² Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale
e la Sicurezza Alimentare dell'Università degli Studi di Milano
mariaada.marzano@unimi.it

³ Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale
e la Sicurezza Alimentare dell'Università degli Studi di Milano
claudia.balzaretti@unimi.it



5.1. INTRODUZIONE

Mangiare sano, in modo equilibrato, senza eccessi e con tanta frutta e verdura sono le regole base per una corretta alimentazione, che è il necessario contributo al mantenimento di un buono stato di salute. I prodotti ortofrutticoli vengono considerati, proprio per la loro ricchezza di sali minerali e vitamine, le fondamenta di un regime alimentare equilibrato; lo attestano anche le ultime modifiche effettuate alla piramide alimentare, dove alla base frutta e verdura hanno soppiantato i cereali.

Gli alimenti sono considerati, nel campo della nutrizione biologica e clinica, un efficace mezzo da affiancare ai trattamenti di prevenzione, cura o convalescenza allo scopo di recuperare quel valore terapeutico ben noto già nel 400 a.C., dove Ippocrate sosteneva l'importanza fondamentale dei cibi in un'ottica di cura.

In questa visione del cibo diviene importante fornire al consumatore alimenti il più possibile ricchi di sostanze nutritive per l'organismo e naturalmente, il meno possibile contaminati da sostanze nocive sia chimiche che microbiche.

L'organizzazione della società odierna permette a ben pochi individui il consumo di prodotti ortofrutticoli freschi e provenienti da coltivazioni che non hanno subito trattamenti (resta da chiarire in questo caso il ruolo dell'agricoltura biologica); il ritmo e lo stile di vita sempre più introducono nell'alimentazione sistemi di conservazione e di cottura che devono essere fortemente valutati e selezionati per non sprecare questo patrimonio di nutrienti utili per l'organismo.

È fondamentale sottolineare come al servizio della nutrizione intervengano più soggetti

(l'agricoltore e l'allevatore, gli ispettori sanitari e gli organi di controllo preposti, il settore della produzione e commercializzazione, gli operatori della salute e il consumatore finale) che svolgono, ciascuno su piani diversi, il compito di garantire la possibilità di poter utilizzare gli alimenti ancora nella concezione ippocratica: "Fa che il cibo sia la tua medicina e che la medicina sia il tuo cibo".

5.2. EVOLUZIONE DELLE LINEE GUIDA ALIMENTARI: LA PIRAMIDE NUTRIZIONALE

L'impatto della nutrizione sullo stato di salute è un concetto ampiamente condiviso in medicina e si pone alla base delle strategie preventive per molte e diverse patologie. In parallelo, lo studio dell'alimentazione sta vivendo un'espansione sempre più marcata dall'ambito strettamente nutrizionale verso altre categorie della cultura e della scienza, che includono le scienze sociali, economiche e soprattutto ambientali.

Nonostante che lo sviluppo e la modernizzazione abbiano reso disponibili a un numero sempre più ampio di persone una grande quantità e varietà di cibo, lo stato nutrizionale della popolazione generale nei Paesi sviluppati è frequentemente caratterizzato da sbilanciamenti ed errori. Le conseguenze di uno stile alimentare non corretto includono l'aumentata prevalenza di patologie croniche, quali le malattie cardiovascolari, l'obesità, il diabete, i tumori, con ripercussioni rilevanti sulla spesa sanitaria.

L'apparente paradosso di un aumento degli squilibri nutrizionali, in presenza di migliorate risorse alimentari, mette in evidenza la forte necessità di un'adeguata cultura della nutrizione e di linee guida che possano essere applicate e adottate facilmente su base quotidiana.

Le raccomandazioni nutrizionali sono state divulgate per lungo tempo attraverso guide e opuscoli informativi spesso di non immediata fruibilità da parte dei cittadini.

L'esigenza di semplificazione dei concetti attraverso immediate e facili indicazioni si è presentata presto, perché diventa utile segnalare quali alimenti consumare con maggiore frequenza (come i vegetali, perché fonte di nutrienti preziosi e apportatori di minori fattori di rischio) e quali invece consumare con maggiore parsimonia.

La piramide alimentare è stata una risposta a questa esigenza e si è posta fin dall'inizio l'obiettivo di riassumere e semplificare le informazioni e le linee guida per un'alimentazione più corretta, orientando nello specifico i consumi in modo favorevole dal punto di vista della prevenzione cardiovascolare.

La prima versione fu pubblicata in Svezia nel 1974. Questa piramide era divisa in due sezioni: la base, che includeva latte, formaggi, margarina, pane, cereali e patate, una larga selezione di prodotti vegetali e frutta, e l'apice, che comprendeva carni, pesce e uova.

5.2.1. La piramide nel modello americano

In seguito, gli Stati Uniti d'America pubblicarono la celebre *Food Guide Pyramid* nel 1992, che fu progettata dall'*United States Department of Agriculture*. Era composta da sei sezioni di immediata lettura (Fig. 1), fu poi modificata nel 2005 e sostituita definitivamente nel 2011 da un altro elemento simbolico, il *MyPlate*.

Dopo circa 40 anni dalla sua prima comparsa, la piramide è stata adottata come sistema "semplice" di informazione alimentare in molti Paesi. Esistono numerosi tipi di piramide alimentare nel mondo, ma in generale il principio con cui sono costruite è lo stesso: alla base si trovano gli alimenti che devono essere consumati tutti i giorni e, via via che si sale verso l'apice, la frequenza di assunzione dei vari cibi si dirada; ad ogni alimento, inoltre, corrispondono delle frequenze di assunzione consigliate.

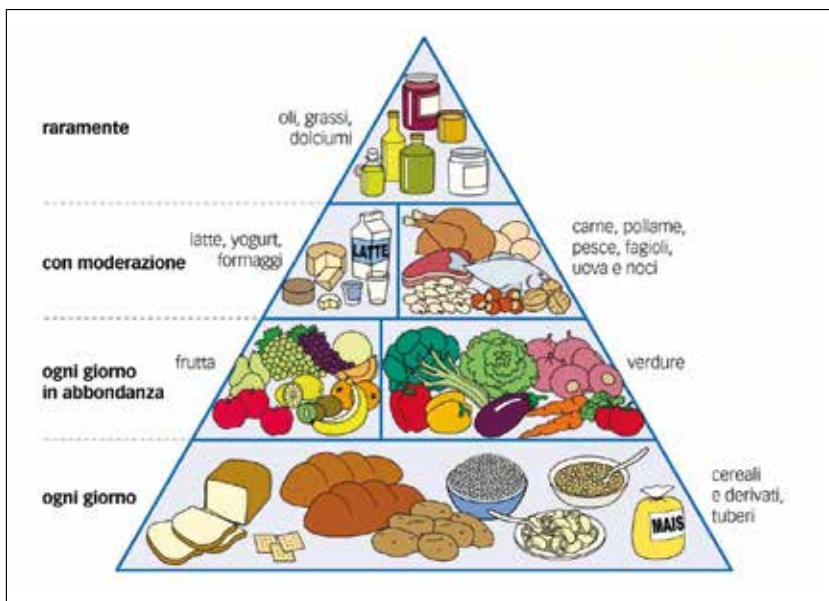


Figura 1 – La piramide alimentare americana del 1992

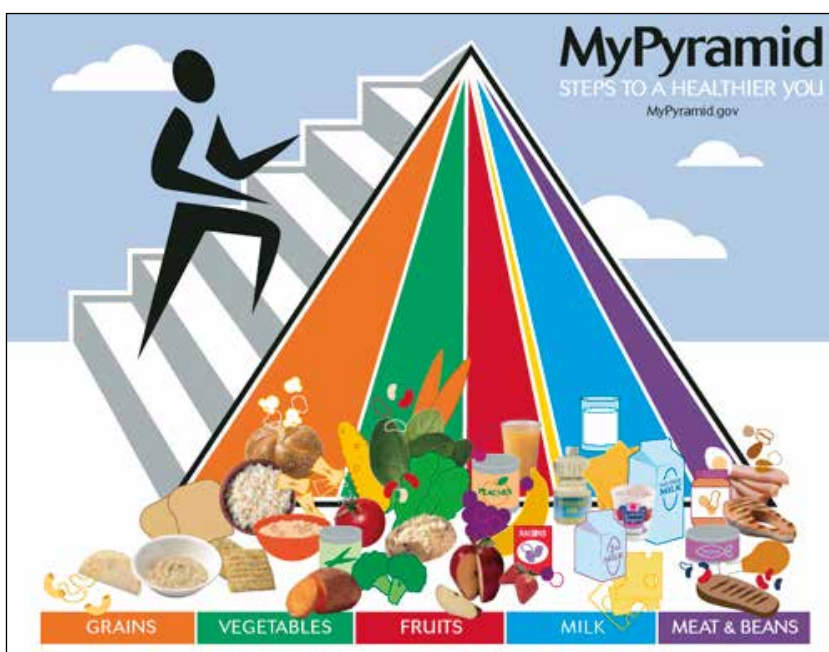


Figura 2 – Nuova piramide alimentare americana del 2005

Gli adeguamenti della piramide alimentare si sono orientati verso la creazione di modelli sempre meno standard e rigidi che tenessero conto dello stile di vita delle popolazioni e delle tradizioni alimentari dei singoli paesi.

Negli Stati Uniti d'America la prima consistente revisione del 2005 riguardò nello specifico l'associazione tra scelte alimentari e svolgimento di attività fisica quotidiana (Fig. 2). I carboidrati complessi devono provenire da alimenti integrali (pane, pasta, riso integrali) ed è consentito il consumo di grassi mono e polinsaturi contenuti negli oli vegetali e nel pesce. Dal gruppo della verdura, da consumare in abbondanza, sono state tolte le patate che, insieme ai cibi ricchi di carboidrati complessi raffinati e ai dolci (contenenti zuccheri semplici), sono salite sulla punta della piramide, tra gli alimenti da limitare. La versione del 2005, composta da sezioni verticali, risultò molto più astratta della prima e poco chiara.

La piramide alimentare nel corso degli anni è stata criticata per essere uno strumento troppo complicato e semplicistico. Inoltre, alcune ricerche effettuate negli Stati Uniti hanno evidenziato che i consumatori erano così familiari con la piramide che non prestavano attenzione ad essa e non attuavano i suoi consigli. Questo ha portato, in concomitanza con la pubblicazione nel 2010 delle nuove Linee Guida Americane per una Sana Alimentazione a proporre, come immagine alternativa alla piramide alimentare, il Miopiatto (*MyPlate*), perché è un simbolo più familiare per i consumatori e strettamente correlato al mangiare.

L'immagine (Fig. 3) è stata disegnata per suggerire alla popolazione come costruire un piatto sano. È interessante osservare che metà di questo piatto deve essere composto da frutta e verdura.

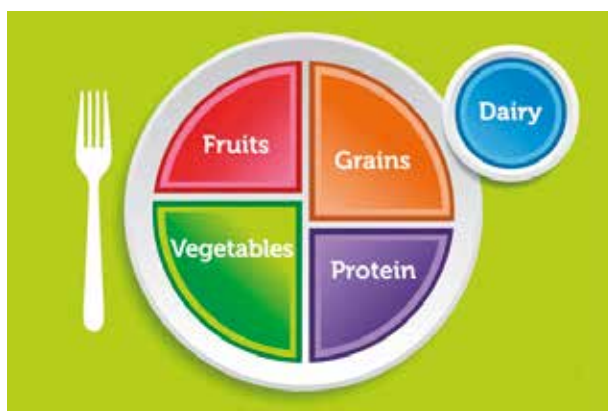


Figura 3 – *MyPlate*, il nuovo simbolo americano

5.2.2. La piramide nel modello mediterraneo

La piramide alimentare della dieta mediterranea è una delle più note in tutto il mondo. Essa è tipicamente basata sul consumo di cereali e derivati, frutta, ortaggi, legumi, olio extravergine di oliva e prodotti ittici. La dieta mediterranea ha origini storiche lontanissime, datata a diecimila anni fa, nella Mezzaluna Fertile, la regione geografica del Medio Oriente considerata la culla della civiltà ed il teatro della nascita e dello sviluppo delle prime forme di agricoltura.

L'adozione di questa tecnica produttiva determinò la comparsa di cereali e derivati, legumi, olio d'oliva, ortaggi, frutta e vino, affiancati ai prodotti della pastorizia (latte e derivati, carne, uova) e della pesca. Tutto ciò, abbinato alle abitudini lavorative non sedentarie delle popolazioni antiche, ha portato gradualmente alla definizione del modello alimentare mediterraneo.

Uno dei primi studi sulla dieta mediterranea avvenne nel 1948, quando le autorità greche incaricarono la *Rockefeller Foundation* di condurre un'indagine epidemiologica sulla popolazione, allo scopo di individuare strategie per migliorarne lo stato di salute. I risultati documentarono un maggior consumo di alimenti di origine vegetale ed un basso apporto di alimenti di origine animale rispetto alla popolazione statunitense.

Oltre ad altre ricerche non mirate, ce ne furono altre strutturate con l'obiettivo di studiare le caratteristiche nutrizionali della dieta mediterranea e dei suoi effetti sullo stato di salute. Il promotore di tutto ciò fu il fisiologo statunitense Ancel Keys.

Keys diede il via agli studi medico-nutrizionali sulla dieta mediterranea, nei primi anni '50 del secolo scorso, e dopo aver intuito la correlazione tra abitudini alimentari e rischio di malattie del benessere (cardiopatie, diabete, ipertensione, dislipidemia, ecc.), condusse uno studio denominato *Seven Countries Study*, allo scopo di documentare la correlazione tra stile di vita, alimentazione e malattie cardiovascolari in popolazioni diverse, anche tramite studi incrociati. Mediante questa ricerca Keys dimostrò che le abitudini alimentari tipiche della dieta mediterranea, ricche di alimenti di origine vegetale, permettevano di ridurre il rischio di malattie del benessere che non erano imputabili a cause genetiche.

Nel 1975 Keys pubblicò il libro *"Eat well and stay well, the Mediterranean way"*. Keys osservò che lo stile di consumo alimentare mediterraneo corrispondeva ad una minore incidenza di malanni dismetabolici e malattie cardiovascolari e attribuì questa evidenza al particolare e naturale equilibrio nutrizionale delle tradizioni alimentari: non solo prodotti, ma anche ricette, modalità di assemblaggio dei pasti. I tratti salienti delle abitudini alimentari e dei prodotti e dei protocolli nutrizionali di tipo mediterraneo sono: la rilevanza nella razione quotidiana dei cereali (frumento, mais, riso) e dei loro prodotti di prima (farine) e seconda trasformazione (pane, pasta); la presenza nella dieta di consistenti quantità di proteine di origine vegetale, derivate dagli stessi cereali e dalle leguminose; l'abbondanza nella razione di ortaggi a foglia e di frutta ed il conseguente apporto abbondante di fibra, vitamine e sali minerali; l'origine prevalentemente vegetale della frazione lipidica e l'impiego generalizzato, come condimento, dell'olio di oliva, con il conseguente rilevante apporto di acidi grassi mono e polinsaturi; l'utilizzo di erbe aromatiche come insapidenti delle formulazioni; la modesta, ma qualitativamente determinante, presenza di latticini, uova, pesci e carni.

In Italia, i ricercatori dell'Istituto di Scienze dell'Alimentazione dell'Università la Sapienza di Roma hanno elaborato nel 2007 una nuova piramide alimentare (Fig. 4), adattata allo stato di salute, alle abitudini alimentari ed allo stile di vita della popolazione italiana di oggi.

La modifica più importante è che alla base della piramide non sono più presenti i cereali, ma i prodotti ortofrutticoli, che hanno sostituito i primi nella sezione, che include gli alimenti di cui si consiglia il consumo più abbondante e frequente. Al piano terra ci sono dunque acqua, frutta e verdura, che nei loro cinque colori rosso, verde, giallo-arancio, bianco e blu-viola sono altamente consigliati per il particolare patrimonio nutrizionale in fitocomposti, importanti nella prevenzione di molte malattie cronico-degenerative. Al primo piano sono presenti gli alimenti ricchi di carboidrati complessi: pane, pasta e riso, patate e biscotti. Il terzo piano comprende i cibi ricchi di proteine di alta qualità biologica: carne e salumi, pesce e prodotti ittici, legumi, uova. Al quarto piano si trovano i grassi da condimento (olio extravergine d'oliva e burro) ed i latticini (latte, yogurt e formaggi). Il quinto piano comprende gli alimenti non fondamentali per la dieta ovvero gli alcolici (vino e birra) e i dolci da condimento (miele e zucchero). All'apice è stata collocata l'attività fisica.

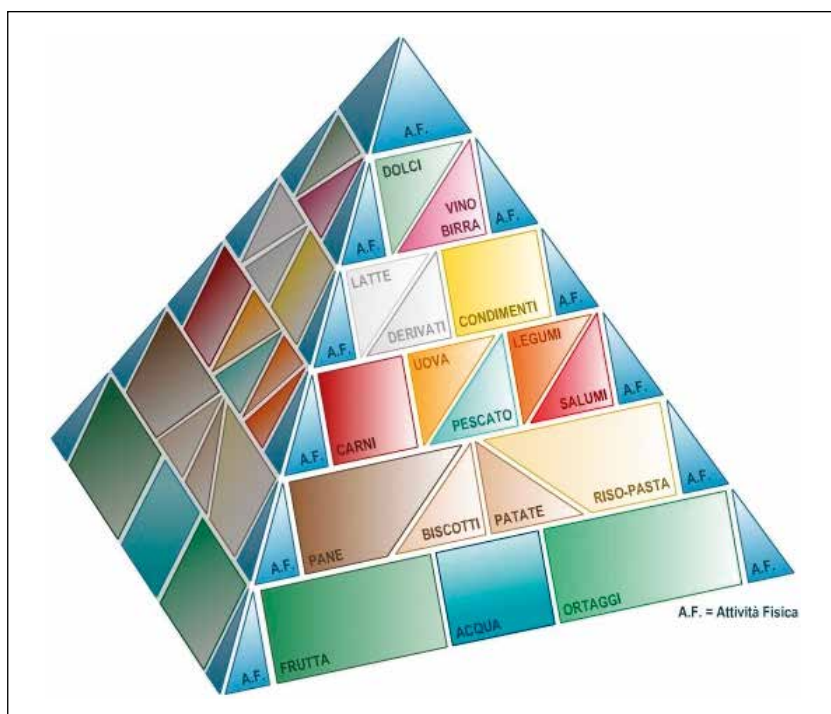


Figura 4 – la nuova piramide alimentare settimanale italiana del 2007

5.3. LA QUESTIONE DEL BIOLOGICO, TRA MITI E REALTÀ: GLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE PROVENIENTI DA AGRICOLTURA BIOLOGICA SONO PIÙ SICURI E SANI DELLE ALTERNATIVE CONVENZIONALI?

L'agricoltura biologica è un modello di coltivazione alternativo al convenzionale, che riguarda la pratica di produrre alimenti senza l'utilizzo di additivi chimici. Questo metodo di coltivazione ha lo scopo di incoraggiare il rispetto verso i cicli biologici dei sistemi produttivi, di mantenere ed aumentare la fertilità del suolo, di minimizzare ogni forma di inquinamento, di evitare l'utilizzo di fertilizzanti sintetici e di pesticidi, di mantenere la diversità genetica, di considerare l'ampio impatto sociale ed ecologico dei sistemi di produzione agroalimentari e di produrre alimenti di qualità in quantità sufficiente.

La produzione globale biologica sta crescendo negli ultimi anni, e si stima che 31 milioni di ettari di terreno siano, in 160 Paesi, dedicati a questo tipo di agricoltura. Il biologico nel mondo ha raggiunto il valore di 59 miliardi di dollari, triplicandosi in 10 anni (nel 2000 17,9 miliardi di dollari) e cresce in percentuali dal 5 al 10% annui. Il 96% della richiesta di biologico proviene dal Nord America e dall'Europa.

Il mercato del biologico in Italia vale circa 3 miliardi di euro e continua a crescere: la spesa domestica di prodotti biologici è salita nel 2010 del 12,1% rispetto al 2009, rafforzando il trend positivo degli ultimi due anni (+6,9% nel 2009, +5,2% nel 2008).

L'Italia è il Paese europeo col maggior numero di produttori, l'ottavo Paese al mondo per superficie coltivata con metodo biologico; il quinto Paese produttore a livello mondiale e il quarto in Europa, dopo Germania, Francia e Regno Unito. Dal punto di vista dei consumi, il biologico rappresenta circa il 3% del fatturato alimentare e solo il 2,3% della popolazione italiana ne fa uso esclusivo, anche se negli ultimi due anni le vendite nei supermercati sono aumentate dell'11,5% e nei negozi specializzati del 15-20%.

I consumatori scelgono di acquistare alimenti biologici per molteplici ragioni, quali l'assenza di additivi chimici, la protezione dell'ambiente dagli effetti dell'uso indiscriminato dei pesticidi delle coltivazioni convenzionali, la protezione della salute umana, il maggior benessere animale e perché è presente la percezione che gli alimenti biologici siano più buoni e salutarì rispetto ai corrispettivi convenzionali. Sempre più consumatori prediligono alimenti privi di organismi geneticamente modificati e, possibilmente, prodotti in aree vicine a quelle di consumo.

L'Unione Europea, come anche le organizzazioni governative nazionali e regionali, supportano l'agricoltura biologica ed il settore alimentare in generale. Alcuni consumatori sono disposti a pagare un prezzo più alto per gli alimenti biologici ed è perciò importante e necessario dimostrare se il prezzo più alto sia giustificato realmente da un valore aggiunto in termini nutrizionali, di sicurezza e di sostenibilità ambientale.

Importanti studi sono stati condotti negli ultimi anni allo scopo di confrontare la qualità e la sicurezza degli alimenti biologici rispetto alle alternative convenzionali. Complessivamente, le evidenze emerse riguardanti la qualità nutrizionale e gli aspetti di sicurezza degli alimenti di origine vegetale studiati (carote, pomodori, lattuga, spinaci, patate) sono state inconcludenti. Malgrado la percezione diffusa che i prodotti biologici siano più nutritivi rispetto alle alternative convenzionali, nella letteratura scientifica prodotta negli ultimi decenni emerge una certa discordanza nei risultati ottenuti.

Nel 2012 Smith e collaboratori hanno condotto una revisione sistematica svolta mediante meta-analisi della letteratura scientifica in lingua inglese pubblicata negli ultimi 50 anni (237 studi), che indagava le eventuali differenze, sia nutrizionali, sia in termini di sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti organici e convenzionali di origine vegetale e animale.

5.3.1. Aspetti nutrizionali

Dagli studi pubblicati, è risultato che, dal punto di vista nutrizionale, non sono emerse differenze significative nei nutrienti valutati, quali acido ascorbico, beta-carotene, alfa-tocofenolo, potassio, calcio, fosforo, magnesio, ferro, proteine, fibre, ad eccezione del contenuto di fosforo e dei composti totali fenolici, che sono risultati essere presenti in concentrazioni statisticamente superiori nei vegetali biologici rispetto ai convenzionali.

Dal punto di vista clinico, il maggior contenuto di fosforo non ha significato in quanto è necessario un assoluto digiuno per produrre una carenza di fosforo nell'uomo. Per ciò che concerne i composti fenolici, anche se non direttamente correlati con la qualità nutrizionale, stanno ricevendo una crescente attenzione, a causa della loro peculiare attività biologica anti-infiammatoria ed antiossidante. I flavonoidi, una classe di composti fenolici, possono ridurre la pressione sanguigna, contribuendo così alla diminuzione del rischio di infarti ed emorragie. Queste sostanze sono state associate altresì al contenimento del rischio di alcuni tipi di cancro. La concentrazione statisticamente più elevata di flavonoidi nei vegetali biologici rispetto ai convenzionali è spiegata, secondo alcuni Autori, dall'assenza di alcuni fertilizzanti nell'agricoltura biologica. I flavonoidi, infatti, sono prodotti dalle piante come meccanismo di difesa, che può essere indotto da carenze nutrizionali, come per esempio la carenza di azoto nel terreno.

Non tutti i composti fenolici sono desiderabili, in quanto alcuni di essi hanno proprietà antinutrizionali. Le antocianine, antoxantine, catechine e tannini possono inibire l'attività di al-

cuni enzimi digestivi come l'alfa-amilasi, la tripsina, la chimotripsina e la lipasi. La presenza di tannini può essere considerata nutrizionalmente indesiderabile, perché riduce la biodisponibilità di macromolecole, come proteine, carboidrati, aminoacidi, vitamine, ioni metallici, formando composti stabili con queste sostanze.

5.3.2. Sicurezza dei prodotti biologici

Per ciò che riguarda il confronto in termini di sicurezza per la salute del consumatore, uno dei punti più importanti riguarda il rischio di contaminazione dei vegetali convenzionali con residui di pesticidi, che dagli studi effettuati è risultato mediamente più alto del 30% rispetto ai biologici. Nonostante sia creduto notoriamente che i vegetali biologici non debbano presentare residui di pesticidi, pochi studi hanno verificato effettivamente la concentrazione di queste molecole, e nella revisione sistematica di Smith è riportato che, inaspettatamente, il 7% dei prodotti vegetali biologici analizzati presentava residui di pesticidi, probabilmente dovuti a trattamenti illeciti oppure a contaminazione crociata.

Per quanto riguarda la contaminazione da tossine fungine e da metalli pesanti, i risultati ottenuti dai vari studi analizzati sono stati discordanti. Nessuna differenza tra biologico e convenzionale è stata rilevata per il rischio di contaminazione con o nei livelli medi di ocratossina A. Livelli più bassi ed un più basso rischio di contaminazione con deossinivalenolo sono stati ritrovati nei cereali biologici rispetto a quelli convenzionali. Nessuna differenza significativa è stata invece evidenziata nei contenuti di piombo e cadmio.

Generalmente i vegetali biologici evidenziano un contenuto inferiore di nitriti e nitrati. I fertilizzanti chimici possono influenzare il metabolismo delle piante; per esempio, i fertilizzanti contenenti azoto, di solito impiegati nelle coltivazioni convenzionali e idroponiche, possono provocare un accumulo di nitrati nei tessuti di alcuni vegetali.

La FAO suggerisce che la dose giornaliera massima di nitrati e nitriti dovrebbe essere, rispettivamente, di 5 e 0.2 mg per kg di peso corporeo. Il problema dell'assorbimento di nitrati può essere pericoloso, in quanto il nitrato può essere ridotto a nitrito nel tratto digerente umano e può avere un ruolo nella formazione di nitrosammine cancerogene, favorite dall'ambiente acido gastrico. Il contenuto dei nitrati deve essere obbligatoriamente tenuto sotto controllo negli alimenti, ed in particolare in quelli destinati all'alimentazione della prima infanzia.

Per quanto riguarda la contaminazione biologica, i risultati degli studi effettuati sono stati anche in questo caso eterogenei e discordanti. È indiscutibile che la coltivazione biologica richiede un' eccellente gestione igienica delle produzioni e gli agricoltori devono porre la massima attenzione all'utilizzo dei fertilizzanti organici, a causa dell'alta probabilità di contaminazione microbiologica (soprattutto batteri di origine fecale animale) e parassitaria. Solo dopo un' opportuna maturazione le deiezioni animali possono essere distribuite sui terreni.

Dalla revisione sistematica di Smith è emerso che solo per quanto riguarda la contaminazione dei vegetali da *Escherichia coli* si è evidenziata una differenza significativa, ed i biologici hanno presentato un rischio di contaminazione del 5% superiore rispetto alle alternative convenzionali.

5.3.3. Proprietà sensoriali

Molti fattori possono influenzare il sapore e l'aroma di un alimento vegetale, come, per esempio, la *cultivar* utilizzata, la tipologia di terreno, le condizioni climatiche, le procedure di coltivazione, i tempi di maturazione. La grande variabilità sensoriale cambia anche a seconda delle modalità di trasporto, di conservazione e dei metodi di preparazione. In relazione alla qualità sensoriale, alcuni studi suggeriscono la superiorità dei vegetali biologici, altri evidenziano il contrario.

Evers nel 1989 verificò che le carote provenienti da agricoltura biologica, sottoposte ad

analisi sensoriale, avevano ricevuto i punteggi di 6.9 e 8.3 per il gusto e la struttura, rispettivamente, su una scala da 1 (inaccettabile) a 9 (eccellente). Mentre le carote provenienti da agricoltura convenzionale ricevevano un punteggio di 8.1 per entrambe le voci. In un altro studio invece, panelisti sottoposti ad addestramento specifico, in un periodo di due anni, classificavano come aventi un gusto migliore le carote coltivate convenzionalmente rispetto a quelle prodotte col sistema biologico.

Zhao e suoi Collaboratori (2007) hanno sottoposto ad analisi sensoriale differenti tipi di alimenti di origine vegetale e non hanno rilevato differenze significative tra biologici e convenzionali. Una differenza significativa nel sapore è stata riscontrata in questo studio solo nel pomodoro, probabilmente dovuta a differenze nel periodo di maturazione tra il prodotto biologico e quello convenzionale.

Nonostante le poche differenze significative in termini di qualità sensoriale, alcuni Autori affermano che gli alimenti biologici presentano un gusto migliore rispetto alle alternative convenzionali e questa opinione è quella che sostanzialmente rimane nei consumatori di prodotti biologici.

In conclusione, dalla letteratura scientifica pubblicata fino ad oggi sulla comparazione degli effetti sulla salute, la nutrizione e la sicurezza dei vegetali biologici verso i convenzionali, si rilevano alcuni parametri a favore del biologico. In particolare, per quanto riguarda il contenuto di pesticidi e di nitrati/nitriti (che è inferiore al convenzionale) e quello di flavonoidi (che è maggiore del convenzionale). Per questi ultimi due parametri il dato sembra collegato al minor uso di fertilizzanti. Vi è comunque la necessità di aumentare la ricerca scientifica, allo scopo di fornire al consumatore una più accurata informazione che consenta una scelta più consapevole degli acquisti.

5.4. IL RUOLO CENTRALE DI FRUTTA E VERDURA NELLA SALUTE UMANA: EFFETTI SULLO STATO INFIAMMATORIO SISTEMICO E CAMPI DI INTERVENTO

Gli alimenti, come è noto, non solo forniscono l'energia necessaria all'organismo per vivere e far fronte alle attività quotidiane, ma esercitano un ruolo centrale nel mantenimento dello stato di salute del soggetto. L'importanza della nutrizione come strumento per il ripristino del benessere e per la cura dell'individuo viene oggi collocata, insieme ad altre variabili (*stress*, inquinamento, stile di vita ecc.) in una visione olistica dell'individuo inteso come unità-mente-corpo.

In questa sezione verranno presentati i vantaggi e gli svantaggi dell'assunzione di frutta e verdura nel controllo dell'infiammazione cronica sistemica. Saranno brevemente illustrati gli effetti sulla risposta insulinica e sull'equilibrio acido-base, le caratteristiche nutrizionali e i metodi da utilizzare per conservare il più possibile integro il patrimonio di vitamine e sali minerali di cui questi alimenti sono ricchi.

5.4.1. *Gli alimenti vegetali come strumenti di controllo dell'infiammazione cronica sistemica*

L'azione che i prodotti ortofrutticoli esercitano sull'infiammazione cronica sistemica è centrale per il mantenimento di un buono stato di salute. In questo contesto scientifico l'alimentazione non è semplicemente vista come riduzione calorica, ma si configura quale fattore attivo. Il cibo si inserisce tra gli strumenti di elezione per la diminuzione dell'infiammazione cronica sistemica, che è considerata negli ultimi anni la base per lo sviluppo della maggior parte delle patologie croniche (sindrome metabolica e diabete, obesità, problematiche cardiovascolari, osteoporosi, depressione ecc.).

Riuscire quindi a diminuirla facendo uso degli alimenti giusti permette davvero di utiliz-

zare il cibo secondo il concetto ippocratico accennato all'inizio del capitolo. Ma in che cosa consiste l'infiammazione cronica? È un processo flogistico di lunga durata in cui coesistono l'infiammazione attiva, la distruzione dei tessuti (quello geneticamente più debole è il più colpito) e i tentativi di riparazione. Caratteristiche principali di uno stato di infiammazione cronica sistemica sono: la perdita delle funzioni della barriera intestinale; l'aumento della responsabilità a stimoli considerati normali con la comparsa di sintomatologie non ascrivibili ad alcuna patologia in particolare, chiamate sintomatologie vaghe aspecifiche o MUS (stanchezza cronica; disturbi del tono dell'umore; insonnia; sonnolenza persistente; gonfiore dopo i pasti; acidità; stitichezza o attacchi di colite; palpitazioni; emicrania, ecc.); l'infiltrazione di cellule infiammatorie in compartimenti dove non sono normalmente rilevate e la sovrapproduzione di molecole pro-infiammatorie.

Per comprendere meglio il quadro entro il quale si inseriscono i meccanismi sopra citati è necessario introdurre e illustrare brevemente i principi di una recente disciplina scientifica: la Psico-neuro-endocrino-immunologia (PNEI). La PNEI studia le connessioni fra sistema psichico, nervoso, endocrino e immunitario: valuta queste strutture come intimamente connesse fra di loro in un *network* bidirezionale.

Il modello PNEI propone la lettura dei meccanismi che stanno a monte di una determinata patologia attraverso una valutazione integrata dell'individuo come entità mente-corpo. Con esso viene a profilarsi un settore di ricerca e di interpretazione della salute e della malattia che considera l'organismo come una unità strutturata e interconnessa, dove i sistemi psichici e biologici si condizionano reciprocamente. Il risultato di questo meccanismo non lineare è l'attivazione di molecole pro-infiammatorie da parte del sistema immunitario che rappresenta il nodo centrale del complesso *network* PNEI. La chiave di lettura delle malattie è legata in particolare al malfunzionamento dei sistemi dello *stress* (neurovegetativo; asse ipotalamo-ipofisi-surrene, HPA; endocrino) che conduce sempre ad un disequilibrio tra i sistemi di regolazione sopra nominati.

Numerosi fattori di disturbo chiamati *stressor*, sia di natura cognitiva-emozionale (*stress* psicosociali ed emozionali) sia di origine non cognitiva (virus, batteri, tossine, alimentazione, inquinamento, stile di vita, ecc.) stimolano la produzione dei mediatori dell'asse dello *stress* e conseguentemente stimolano la produzione da parte del sistema immunitario di molecole pro-infiammatorie. In caso di persistenza di uno o più *stressor* (e quest'ultima situazione è di solito quella più comune), l'organismo non è più in grado di "spegnere" la continua risposta infiammatoria. La conseguenza di questo stato è lo sviluppo di una infiammazione cronica sistemica denominata appunto infiammazione minima persistente (*low inflammation*). Tale processo, una volta avviato, tende ad autoalimentarsi con il risultato di un sovraccarico tossinico dell'organismo che non riesce più a recuperare la situazione di equilibrio originaria. Se più eventi si sommano (cognitivi e non) operando sui medesimi segnali molecolari, il valore soglia individuale, al di sotto del quale non viene percepito alcun disturbo se non qualche MUS, viene superato ed il soggetto esprime allora un sintomo. Un intervento sistemico per il recupero di un equilibrio fisiologico-metabolico il più possibile efficace deve quindi essere basato sulla diminuzione dei diversi *stressor* (compreso quello alimentare). Tale intervento va effettuato allo scopo di riportare l'organismo all'interno della propria capacità di tolleranza e questo può essere ottenuto solo diminuendo il sovraccarico infiammatorio. È necessario abbassare l'*input* degli *stressor* in ingresso e creare una "valvola di scarico" in uscita.

Varie componenti della dieta (acidi grassi polinsaturi, vitamine, antiossidanti, flavonoidi) sono potenzialmente in grado di modulare la predisposizione alle condizioni infiammatorie croniche e in conseguenza esercitano un importante ruolo nella terapia di recupero dello stato infiammatorio. La nutrizione diviene quindi uno degli innumerevoli fattori che contribuiscono al controllo o/e viceversa all'amplificazione dell'infiammazione cronica. Ad esempio, è nel sapere comune come una dieta ricca di frutta e verdura apporti antiossidanti, vitamine

e sali minerali utili per il mantenimento di un buono stato di salute, ma è di acquisizione più recente la scoperta di come questi componenti della dieta siano in grado di modulare l'attività simpatica, lo *stress* ossidativo, l'attivazione di fattori di trascrizione nucleare per molecole pro-infiammatorie.

In generale, una dieta che promuove l'infiammazione è ricca di zuccheri, amidi raffinati, grassi saturi e povera in omega 3, antiossidanti naturali, fibre della frutta e dei vegetali e carboidrati integrali e non raffinati. Inoltre, come accennato in precedenza, non tutta la frutta e la verdura vanno considerate indiscriminatamente all'interno di un regime alimentare che fa del cibo uno degli strumenti primari di prevenzione e detossinazione. Se il principio è quello di "alleggerire" l'organismo, va assolutamente ostacolata l'assunzione di sostanze ad effetto antitetico. Ragionando, per esempio, tenendo in considerazione il concetto di livello di tolleranza, che non deve essere superato, è importante ricordare come alcuni tipi di frutta e verdura (agrumi, ananas, banane, fragole, lamponi, uva, fichi, datteri, pomodori, spinaci, peperoni, melanzane) contengano sostanze istamino-simili che provocano la liberazione di istamina e andrebbero quindi eliminati non solo nei soggetti con allergie, ma in soggetti che presentano i segni sintomatici (sintomi vaghi aspecifici e metabolici) di una *low inflammation*. Inoltre, anche se in bassa quantità, pomodori, melanzane, peperoni e spinaci contengono tiramina. Si tratta di un aminoacido che insieme alla fenilalanina può provocare liberazione di istamina nei tessuti e causare il rilascio di noradrenalina, stimolante chimico cerebrale che procura eccitazione e favorisce l'insonnia.

Asparagi, cavoli, cavolfiori, pomodori, spinaci, prugne secche presentano un contenuto medio di nichel (da 200 a 1000 g/kg) e numerosi tipi di frutta e verdura sono ricchi di salicilati che possono creare reazioni soprattutto topiche.

Ma quali sono le proprietà intrinseche di questi prodotti che ne fanno un alimento così prezioso per la nostra salute?

5.4.2. Le qualità nutrizionali di frutta e verdura

Per chiarire cosa si intende per valore nutrizionale è opportuno sottolineare come la valutazione globale di un prodotto alimentare si basi sulla determinazione di vari parametri, che sono: parte edibile (parte realmente utilizzabile come alimento), acqua contenuta (che è considerata come un diminuento del valore nutrizionale), proteine (considerate per il loro valore plastico), lipidi (considerati per il loro valore energetico), glucidi (considerati come valore energetico tranne la fibra che non possiede valore nutritivo), sali minerali, vitamine, aminoacidi.

Questi parametri qualificano il valore nutritivo di un alimento che qualitativamente e quantitativamente deve essere in grado di soddisfare le esigenze fisiologiche di un organismo. I fabbisogni alimentari (energetico, proteico, idrico, vitaminico e di sali minerali) devono essere coperti dai principi nutritivi contenuti nei cibi.

Tra i prodotti ortofrutticoli, la frutta forma un gruppo di alimenti più omogeneo che non gli ortaggi e le verdure. Esistono però variazioni nel valore nutritivo e nella possibilità di conservazione in relazione al tipo di buccia (la frutta a buccia spessa è meno fragile di quella a buccia sottile), al colore (la frutta molto colorata è ricca di vitamina A e C), alla specie e diversità genetica e al grado di maturazione alla raccolta.

È alla piena maturità che frutta e verdura raggiungono il massimo delle loro qualità gustative e nutritive, ma deve essere ben inteso che questa condizione è presente se il cibo è lasciato maturare in natura. I carboidrati sono zuccheri semplici, in particolare nella frutta il fruttosio risulta facilmente digeribile e rapidamente assorbito. La fibra vegetale è prevalentemente pectina ed emicellulosa.

Gli ortaggi non presentano una struttura biologica comune, ma derivano da parti diverse di molte piante: di alcune (lattuga, spinaci) si utilizzano le foglie, di altre (carote, rape, rava-

nelli) le radici; di altre ancora i frutti; del sedano il fusto; del cavolfiore, del broccolo e del carciofo l'infiorescenza.

L'apporto di carboidrati è variabile; ad esempio carote, zucca e barbabietole ne contengono in maggiore quantità, ma naturalmente si rimane sempre in valori particolarmente contenuti. Mangiare "colorato" consente di usufruire di queste componenti che sono distribuite in modo differente all'interno dei diversi tipi di ortaggi. Comuni sono invece le caratteristiche nutrizionali generali: poche proteine, pochi grassi, amido praticamente assente; sono invece ben rappresentati i principi nutritivi non energetici degli ortaggi, quali acqua, minerali, vitamine. I minerali sono sostanze inorganiche che svolgono nell'organismo importanti funzioni sia di regolazione che metaboliche (coenzimi); l'organismo li elimina continuamente e devono essere costantemente introdotti con la dieta. Potassio, calcio, magnesio e ferro ad esempio sono assunti con la dieta per circa 1/5 dell'apporto totale.

Anche le vitamine, che sono sostanze organiche molto diverse fra loro, risultano vitali per i processi fisiologici e metabolici e vanno introdotte con il cibo. Sono contenute in misura variabile sia negli alimenti animali che in quelli vegetali. Circa la metà dell'apporto di vitamina A è assicurato dall'assunzione di frutta e verdura. Tale molecola è presente in particolare in albicocche, cachi, zucca, carote, bietta, peperoni gialli e verdi, spinaci, lattuga ecc. Anche la vitamina C è introdotta esclusivamente da frutta e verdura.

Di vitamina C ne sono ricchi i frutti a carattere acidulo e gli ortaggi prevalentemente a gemma. Alcuni alimenti di questo gruppo forniscono anche importanti quantità di vitamina A. Altre vitamine presenti nei prodotti ortofrutticoli sono: B2, B1, B12, E, acido pantotenico e biotina. Le verdure verde chiaro, ad esempio, offrono vitamine, minerali e una notevole quantità di cellulosa e carboidrati necessaria per introdurre fibre nella dieta. Va ricordato che le fibre presenti negli ortaggi sono insolubili (cellulosa, emicellulose e lignine) e vengono, come precedentemente accennato, degradate dalla flora microbica intestinale, contribuendo così a regolarizzare la funzionalità intestinale.

5.4.3. Importanza dei prodotti ortofrutticoli nella regolazione del carico glicemico

Le proprietà dei cibi, frutta e verdura compresi, vanno considerate alla luce delle caratteristiche della persona, che deve essere vista come una complessa "officina" dotata di strumenti unici e che quindi può fornire per ciascun cibo risposte differenti. Il soggetto non è semplicemente "obeso" o "diabetico", ma è piuttosto caratterizzato da una precisa storia clinica che può alterare i suoi processi metabolici.

È evidente che queste modifiche devono essere prese in considerazione nell'elaborazione di uno specifico approccio nutrizionale. Persone diverse per sintomatologia, assetto ormonale, composizione corporea, stato metabolico e patologico, manifesteranno necessariamente reazioni diverse al medesimo alimento. Se invece di soffermarci sulla tipologia del cibo ne prendiamo in considerazione la valenza alcalinizzante o basificante ed il carico glicemico, diviene fondamentale, per agevolare le risposte di normalizzazione fisiologica, associare combinazioni corrette di cibi e considerare per essi orari ben precisi di assunzione. Secondo questo punto di vista frutta e verdura devono essere inserite in abbondanza nell'alimentazione quotidiana, ma vanno selezionate alcune tipologie, definite sulla base dello stato metabolico-infiammatorio del soggetto.

Le verdure in generale hanno un indice glicemico molto basso e quindi hanno poco effetto sulla risposta insulinica. Il concetto di carico glicemico è conseguente a quello di indice glicemico: se il termine "carico glicemico" sintetizza le proprietà dei vari carboidrati e la loro capacità di innalzare la glicemia del sangue, l'indice glicemico è un valore che permette di formulare una previsione sull'andamento della curva glicemica in seguito all'assunzione di un alimento o di un pasto complesso. Il carico glicemico è definito quale prodotto dell'indice

glicemico per la quantità di carboidrati espressa in grammi divisa per 100: pertanto un indice glicemico pari ad 1 corrisponde all'assunzione di un grammo di glucosio. Il carboidrato presente invece nella frutta è principalmente una fibra solubile, la pectina. Essa è in grado di ridurre, una volta giunta nell'intestino, l'assorbimento di lipidi e colesterolo. Poiché ogni tipo di frutta ha un determinato indice glicemico, è utile porre attenzione all'orario di assunzione di tali alimenti, considerando che la risposta insulinica è collegata al metabolismo del singolo individuo.

La regolazione del carico glicemico presenta effetti positivi sul metabolismo dei carboidrati, dei lipidi e degli aminoacidi: una glicemia post-prandiale elevata (che equivale ad un pasto ricco di carboidrati) può portare ad un aumento della produzione di radicali liberi e di citochine pro-infiammatorie. Il controllo del carico glicemico mediante l'utilizzo degli alimenti nelle finestre orarie corrette è ancora più importante se si pensa che anche i farmaci per il controllo della glicemia postprandiale nei diabetici aumentano lo *stress* ossidativo.

La frutta, che fornisce un determinato carico glicemico, se mangiata nelle ore serali stimola l'insulina che, nelle ore notturne andrebbe tenuta a riposo per consentire l'attivazione di altri tipi di ormoni prevalentemente anabolici.

In altre parole, la valutazione della risposta metabolica nelle 24 ore deve essere regolata per evitare picchi iperglicemici (con stoccaggio di tessuto adiposo a discapito della massa magra) o fenomeni di ipoglicemia reattiva ove questi processi interferiscano con il recupero dei ritmi circadiani ormonali fisiologici del cortisolo (uno degli ormoni dello *stress*) o con l'attività notturna dell'ormone della crescita impedendo, in tal modo, un'attività anabolica di ricostruzione delle strutture organiche e favorendo i processi catabolici che invece causano l'aumento dell'infiammazione.

5.4.4. Importanza dei prodotti ortofrutticoli nella regolazione dell'equilibrio acido-base

I vegetali, con il loro contenuto di acidi organici (acido citrico, malico, tartarico, benzoico ecc.) svolgono una importantissima azione nel mantenere l'equilibrio acido-base dell'organismo, combattendo l'azione acidificante legata al consumo di proteine e carboidrati (escluse le patate).

I processi che avvengono nel corpo portano a continue variazioni del pH, in un costante susseguirsi di apporto-eliminazione di "acidi" e "basi" che determinano modifiche nella concentrazione dello ione idrogeno con conseguente variazione del pH dell'organismo che deve tamponare tali variazioni per mantenere il pH fisiologico.

In particolare, il metabolismo proteico porta alla formazione di acido solforico e fosforico che devono essere escreti per via renale: si verifica un aumento di produzione da parte dell'organismo di sostanze acide di scarto (cataboliti) che sono riversate nell'ambiente extracellulare.

Un'alimentazione iperproteica e ricca di carboidrati (alimenti acidi), insieme a *stress*, stile di vita errato, insufficiente apporto di liquidi, uso prolungato di farmaci ecc. causa un aumento dello stato di acidosi che se protratto può provocare disturbi differenti (stanchezza cronica, disturbi del sonno, dolori articolari, ecc.).

Uno degli effetti è anche la perdita di massa magra; tale meccanismo catabolico contribuisce ad incrementare l'accumulo tossinico e di conseguenza ad esacerbare lo stato infiammatorio che, a sua volta, causa ancora acidosi e fenomeni ossidativi.

Tra le conseguenze patologiche più importanti dell'acidosi va annoverata l'osteoporosi. Il tessuto osseo riveste infatti un ruolo fondamentale nel bilanciamento del pH corporeo poiché, per contrastare lo stato di acidosi, si rende necessaria una mobilitazione degli ioni calcio.

Un'alimentazione basificante, ricca di frutta e verdura, offre quindi una potenzialità enorme sul benessere dell'individuo. La produzione netta di acido endogeno nel campo della nu-

trizione può essere stimata grazie al calcolo del potenziale acido renale (PRAL, *Potential Renal Acid Load*).

Il PRAL di un cibo viene calcolato in base al suo contenuto di proteine, fosforo, potassio, magnesio e calcio, tenendo conto della capacità di assorbimento intestinale dei singoli microelementi. Gli alimenti a PRAL positivo sono quelli in cui prevale la componente acidificante, mentre quelli a PRAL negativo hanno un carattere alcalinizzante. Il consumo quindi di pranzi e cene “tamponate” con verdura aiuta il mantenimento dell’equilibrio acido-base e l’assunzione della frutta, meglio se lontano dai pasti, contribuisce al bilancio giornaliero di una dieta a PRAL negativo.

5.4.5. Proprietà antiossidanti della frutta e della verdura

Esiste una forte interazione fra *stress* ossidativo e infiammazione. Le proprietà antiossidanti dei vegetali e della frutta si ritiene siano uno dei meccanismi fondamentali per l’azione anti-infiammatoria presente nella dieta e di conseguenza per gli effetti preventivi che svolgono su diverse patologie anche a carattere degenerativo.

Molecole ossidanti quali il radicale superossido o il perossido di idrogeno che, prodotti durante il metabolismo degli alimenti, sono parte della risposta anti-infiammatoria dell’ospite contro batteri e virus, possono attivare una via metabolica promuovendo l’infiammazione e l’infiammazione a sua volta aumenta la produzione di radicali liberi.

Un meccanismo efficace per ottenere la diminuzione della produzione di mediatori infiammatori è quello di prevenire lo *stress* ossidativo. L’organismo umano producendo degli antiossidanti endogeni come la superossido-dismutasi, la catalasi e il glutatone, si difende in parte dai radicali liberi già da solo, ma quando il livello di ossidoriduzione supera una certa soglia è necessario un apporto esterno di antiossidanti.

I principali agenti antiossidanti derivano da minerali (es.: zinco, rame, manganese, molibdeno e selenio), pigmenti vegetali (esempio: estratto di tè verde, licopene, estratto di vite rossa), vitamine (es: B1, B2, B6, B12, niacina, acido folico, acido pantotenico, E, beta-carotene) ed enzimi.

Una maggiore introduzione di frutta e verdura risulta quindi associata ad un abbassamento dello *stress* ossidativo e dell’infiammazione cronica sistemica attraverso la diminuzione dei mediatori infiammatori prodotti mediante azione sulla loro espressione genica e riduzione della produzione di composti ossidanti.

L’azione persistente dell’elevato *stress* ossidativo è causa dell’insorgenza di numerose patologie croniche dovute ad un invecchiamento cellulare precoce.

Tra le diverse classi di antiossidanti presenti nei prodotti ortofrutticoli i più comuni sono: vitamina C, carotenoidi (i pigmenti dalla colorazione gialla, arancione e rossa di cui sono ricchi i vegetali e i frutti giallo-arancio per la presenza di beta-carotene e quelli rossi per la presenza di licopene); i composti fenolici (presenti in elevata concentrazione praticamente in tutti gli alimenti di origine vegetale e nell’uva); i tocoferoli (presenti nei semi oleosi e negli ortaggi a foglia verde). Inoltre, il consumo di tali cibi può assicurare un apporto rilevante di alcuni minerali (quali selenio e zinco) che rientrano nei sistemi di difesa antiossidante dell’organismo.

Vanno poi ricordati i folati, le vitamine di cui sono ricche le verdure a foglia, alcuni agrumi e altri vegetali, i quali, insieme ad altre vitamine del gruppo B, possono contribuire a ridurre il livello di omocisteina ematica, noto come fattore di rischio per le malattie cardiovascolari.

I folati sono inoltre importanti in età fertile per proteggere il feto da possibili malformazioni. Si ritiene che gli effetti antiossidanti siano dovuti soprattutto all’azione congiunta e sinergica di molteplici costituenti presenti nell’alimento; da qui l’importanza di una alimentazione ricca di frutta e verdura che non può essere sostituita dall’utilizzo indiscriminato di integratori.

5.4.6. Decadimento del valore nutrizionale di frutta e verdura

È già stato sopra puntualizzato come l'assorbimento e la quantità di nutrienti richiesti sia dipendente dalle singole condizioni dell'individuo. Infatti i livelli di assunzione giornalieri raccomandati di nutrienti (LARN), che indicano le assunzioni giornaliere consigliate, si riferiscono a soggetti in buono stato di salute senza richiesta di fabbisogni nutrizionali aggiuntivi. Le porzioni indicate riportano inoltre il valore nutrizionale integro del prodotto, che può decadere nettamente a seconda del livello di freschezza e in dipendenza del tipo di cottura e di conservazione.

Un frutto colto da un albero offre per intero le vitamine e micronutrienti che già subiscono un netto decadimento nei giorni successivi. Frutta e verdura, che normalmente vengono conservate dai 3 ai 7 giorni, andrebbero consumate il più rapidamente possibile dopo il raccolto per poter pienamente usufruire delle proprietà nutrizionali.

Importante è limitare l'influenza di fattori quali stoccaggio, trasporto, cottura ed esposizione all'aria e alla luce; è raccomandabile quindi acquistare verdure di stagione coltivate in zona, abbinando una conservazione effettuata a regime refrigerato e al buio.

Esiste naturalmente un diverso grado di vulnerabilità fra i vegetali, che dipende dalla superficie esposta all'aria, dal contenuto di gruppi sulfidrilici e dalla loro diversa attività enzimatica. La perdita di vitamina C, ad esempio, è probabilmente dominata da processi di ossidazione causati da reazioni enzimatiche. I piselli, se stoccati nel loro baccello, risultano maggiormente protetti, così come le carote, che sembrerebbero non eccessivamente danneggiate durante il raccolto. La vitamina A e i carotenoidi sono però sensibili all'esposizione alla luce; all'altro estremo troviamo gli spinaci.

Nella preparazione delle verdure è opportuno non tagliarle e sbucciarle troppo in anticipo perché ciò concorre ad aumentare il rischio di ossidazioni. Come si può osservare, le buone pratiche di conservazione e consumo sono in linea anche con le azioni da effettuarsi per il contenimento del rischio microbiologico.

Ad esempio, stoccare il prodotto in un luogo fresco e asciutto, meglio in frigorifero; tagliarlo a pezzi di media grandezza (minore è la superficie esposta più basso è il substrato a disposizione della flora microbica).

Lo scopo dei trattamenti di conservazione è quello di prolungare la durata degli alimenti mantenendo il più possibile intatte le caratteristiche nutrizionali e biologiche. La modificazione essenzialmente dei parametri quali l'acqua e la temperatura sono i metodi maggiormente in uso; c'è però da chiedersi cosa accade al valore nutritivo.

Per la conservazione dei prodotti ortofrutticoli, le tecniche che utilizzano il freddo sono ancora le migliori rispetto all'uso delle alte temperature, che dal punto di vista nutrizionale danno un risultato nettamente inferiore.

Il raffreddamento è un sistema che blocca l'azione degli enzimi e lo sviluppo dei microrganismi (senza eliminarli). Da un punto di vista nutrizionale è preferibile surgelare i prodotti. La surgelazione consente all'acqua di non solidificarsi in grossi cristalli e durante lo scongelamento, se effettuato in maniera adeguata, non avviene la rottura delle cellule con conseguente perdita di liquidi e preziose sostanze nutritive. Il surgelamento preserva molto bene vitamine e sali minerali, addirittura meglio della normale conservazione in frigorifero. Il miglior modo per scongelare è porre gli alimenti per tempo nel frigorifero. Negli spinaci, per esempio, dopo un giorno di raccolta il contenuto rispetto al prodotto fresco di vitamina C è del 40%, nei surgelati del 69%; il ferro è il 64,5% nel surgelato rispetto al valore di 100% del ferro originale.

Gli alimenti disidratati conservano bene il valore nutrizionale e le eventuali modifiche rilevate sono dovute alla preparazione preliminare. Va però precisato come questi procedimenti contribuiscano a concentrare qualsiasi tipo di sostanza chimica presente nel prodotto.

La cottura modifica sia dal punto di vista chimico, fisico e organolettico l'alimento. È an-

che un metodo di sanificazione perché permette di ridurre il numero o, in alcuni casi, eliminare i microrganismi eventualmente presenti ma, per la maggior parte, distrugge anche i nutrienti sensibili al calore o ne provoca la dispersione.

La cottura naturalmente non va demonizzata. In alcuni prodotti migliora le caratteristiche organolettiche ed elimina sostanze nocive quali, ad esempio, i nitrati contenuti in elevate quantità in lattuga e spinaci. Gli spinaci durante la cottura li rilasciano nell'acqua che deve quindi essere eliminata; è buona cosa inoltre consumare subito dopo la preparazione questa verdura.

I fattori principali da considerare sono quindi la quantità di acqua utilizzata (meno è, minore è l'effetto dilavante) e la temperatura/tempo di cottura (che causa denaturazione delle vitamine).

Dal punto di vista della conservazione del valore nutrizionale, il metodo di cottura migliore è risultato essere il microonde, seguito dalla cottura al vapore, dalla stufatura e dalla brasatura. Tra le vitamine idrosolubili non si registrano grandi cali e le liposolubili potrebbero essere invece soggette a fenomeni di degradazione. La bollitura invece porta ad un enorme calo delle componenti nutrizionali. I prodotti ortofrutticoli sottoposti a prolungata cottura in acqua presentano notevoli perdite di vitamine (per distruzione termica) e minerali (per solubilizzazione).

Le vitamine idrosolubili sono tutte instabili al calore; la perdita di vitamina C può arrivare anche all'80%. Le perdite maggiori per la cottura in forno si verificano soprattutto durante i trattamenti alle alte temperature per tempi relativamente lunghi.

BIBLIOGRAFIA

Monografie

- 1) Bettin A., Mandatori M. (2002). *Manuale della nutrizione olistica*. Ed. Tecniche nuove, 2002.
- 2) Bottaccioli F. (2009). *PsicoNeuroEndocrinoImmunologia*. Ed. RED, 2009.
- 3) Speciani A. (2007). *Guarire le intolleranze*. Ed. Tecniche nuove, 2007.

Quaderni

- 1) Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione, INRAN (2003) "Linee guida per una corretta alimentazione italiana" ; http://www.inran.it/files/download/linee_guida/lineeguida_intro.pdf
- 2) Società italiana di nutrizione umana, SINU (2012) "LARN, Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia per la popolazione italiana".
- 3) http://www.sinu.it/documenti/20121016_LARN_bologna_sintesi_prefinale.pdf

Articoli scientifici

- 1) Basedovsky H. e Rey A. (2007). Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain, Behavior and Immunity*, 21, 34-44
- 2) Batte, M.T., Hooker, N.H., Haab, T.C., Beaverson, J. (2007). Putting their money where their mouths are: consumer willingness to pay for multi-ingredient, processed organic food products. *Food Policy*, 32, 145-159.
- 3) Black P.H. (2003). The inflammatory response in an integral part of the stress response: implication for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome. *Brain, Behavior and Immunity*, 17, 350-364.
- 4) Bourn, D., Prescott, J. (2002). A comparison of the nutritional value, sensor qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 42, 1-34.

- 5) Brandt, K., Molgaard, J.P. (2001). Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 924-931.
- 6) Calder P.C. et coll. (2009). Inflammatory disease processes and interaction with nutrition. *British journal of Nutrition*, 101 (suppl. S1).
- 7) Carvalho, A.M., Junqueira, A.M.R., Vieira, J.V., Botelho, R. (2005). Análise sensorial de genótipos de cenoura cultivados em sistema orgânico e convencional. *Horticultura Brasileira*, 23, 805-809.
- 8) Confederazione Italiana Agricoltori. Manuale di corretta prassi igienica per le imprese agricole. Disponibile al link: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pagineAree_1187_listaFile_itemName_3_file.pdf
- 9) Dangour, A.D., Dodhia, S.K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 680-685.
- 10) EFSA (2010). Statement on possible public health risks for infants and young children from the presence of nitrates in leafy vegetables. *Journal European Food Safety Authority*: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1935.pdf>
- 11) Evers, A.M. (1989). The role of fertilization practices in the yield and quality of carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural Science in Finland*, 61, 329-360.
- 12) Favell D.J. (1998). A comparison of the vitamin C content of fresh and frozen vegetables. *Food Chemistry*, 62, 59-64.
- 13) Haglund, A., Johansson, L., Berglund, L., Dahlsted, L. (1999). Sensory evaluation of carrots from ecological and conventional growing systems. *Food Quality and Preference*, 10, 23-29.
- 14) Hoefkens, C., Sioen, I., Baert, K., De Meulenaer, B., De Henauw, S., Vandekinderen, I., Devlieghere, F., Opsomer, A., Verbeke, W., Van Camp, J. (2010). Consuming organic versus conventional vegetables: the effect on nutrient and contaminant intakes. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3058-3066.
- 15) International Federation of Organic Agricultural Movements (1998). Basic standards for organic production and processing. In: IFOAM General Assembly, Argentina.
- 16) ISMEA (2011), *Osservatorio dei prodotti biologici*, 6, 22 Giugno, p. 7 Jolly, D.A., Schutz, H.G., Diaz-Knauf, K.V., Johal, J. (1989). Organic foods: consumer attitudes and use. *Food Technology*, 43, 60-66.
- 17) Kiecolt-Glaser J.K. (2010). Stress, food and inflammation: Psychoneuroimmunology and nutrition at the cutting edge. *Psychosomatic Medicine*, 72, 365-369.
- 18) Lima, G.P. & Vianello, F. (2011). Review on the main differences between organic and conventional plant-based foods. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1-13.
- 19) Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A. (2003). Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 54, 357-371.
- 20) Mitchell, A.E., Hong, Y.J., Koh, E., Barrett, D.M., Bryant, D.E., Denison, R.F., Kaffka, S. (2007). Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6154-6159.
- 21) Regolamento CE N. 834/2007 del Consiglio del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento CEE N. 2092/91. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 20.07.2007, L 189.
- 22) Regolamento CE 1881/2006 del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 20.12.2006, L 364/5.

- 23) Rembialkowska, E. (2003). Organic farming as a system to provide better vegetable quality. *Acta Horticulturae*, 604, 473-479.
- 24) Ren, H., Endo, H., Hayashi, T. (2001). Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated green vegetable using water-soluble chitosan as a soil modifier and leaf surface spray. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1426-1432.
- 25) Robinson-O'Brien, R., Larson, N., Neumark-Sztainer, D., Hannan, P., & Story (2009). Characteristics and dietary patterns of adolescents who value eating locally grown, organic, nongenetically engineered, and nonprocessed food. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 41, 11-18.
- 26) Roussos, P.A., & Gasparatos, D. (2009). Apple tree growth and overall fruit quality under organic and conventional orchard management. *Scientia Horticulturae*, 123, 247.
- 27) Samman, S., Kung, F.P., Carter, L.M. et al. (2009). Fatty acid composition of certified organic, conventional and omega-3 eggs. *Food Chemistry*, 116, 911-914.
- 28) Smith-Spangler, C., Brandeau, M.L., Hunter, G.E., Bavinger, C., Pearson, M., Eschbach, P.J., Sundaram, V., Liu, H., Schirmer, P., Stave, C., Olkin, I., Bravata, D.M. (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives?. *Annals of internal medicine*, 157, 5, 348-366.
- 29) Shewfelt R. (1990). Sources of variation in the nutrient content of agricultural commodities from the farm to the consumer. *Journal of food quality*, 13, 37-54.
- 30) Stephani J. et coll. (2011). Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentals*, 59, 161-177
- 31) Wallace T.C. et coll. (2011). Human gut microbiota and its relationship to health and disease, 69, 392-403.
- 32) Weibel, F.P., Bickel, R., Leuthold, S., Alföldi, T. (2000). Are organically grown apple tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. *Acta Horticulturae*, 517, 417-426.
- 33) Willer, H. & Yussefi, M. (2006). The world of organic agriculture. Statistics and Emerging Trends SOL, 2006. <http://orgprints.org/5161/1/yussefi-2006-overview.pdf>
- 34) Williams, P.R., Hammitt, J.K. (2000). A comparison of organic and conventional fresh produce buyers in the Boston area. *Risk Analysis*, 20:735-746.
- 35) Williams, P.R., Hammitt, J.K. (2001). Perceived risks of conventional and organic produce: pesticides, pathogens, and natural toxins. *Risk Analysis*, 21:319-330.
- 36) Woese, K., Lange, D., Boess, C., Bögl, K.W. (1997). A comparison of organically and conventionally grown foods – results from a review of the relevant literature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 281-293.
- 37) Worthington, V. (2001). Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7, 161-173.
- 38) Zhao, Z., Chambers, E. IV, Matta, Z., Loughin, T.M., Carey, E.E. (2007). Consumer sensory analysis of organically and conventionally grown vegetables. *Journal of Food Science*, 72, S87-S91.

Siti Internet consultati

- 1) <http://www.ulss.belluno.it/public/File/SIAN/Nutrizione/Linee%20Guida%20corretta%20alimentazione%20italiane-%20INRAN%20'03/Approfondimenti%20Nutrizionali%20INRAN%2005.pdf>
- 2) http://www.portaledinu.it/press/pubblicazioni/MUS_HPA_inflammation_rev0.pdf
- 3) http://www.portaledinu.it/press/pubblicazioni/Nutrizione_clinica_nuove_applicazioni_rev0.pdf
- 4) http://www.portaledinu.it/press/pubblicazioni/PRAL_GL_Inflammation_Stress_rev0.pdf

- 5) <http://www.portaledinu.it/press/pubblicazioni/acidosi%20fissa%20volatile%20sistemi%20tampone%20ver0.pdf>
- 6) <http://www.choosemyplate.gov/>
- 7) <http://www.gedeone-e-coop.it/fatti.asp?fact=45>
- 8) http://www.nutrienergia.it/fileManager/piramide_alimentare_italiana.pdf
- 9) www.piramidealimentare.it
- 10) <http://www.organic-world.net/fileadmin/documents/yearbook/2012/fibl-ifoam-2012-summary.pdf>
- 11) Sezione di Scienza dell'alimentazione Dipartimento di Fisiopatologia Medica, Sapienza Università di Roma. *Piramide alimentare italiana – Guida settimanale per uno stile di vita salutare*. Disponibile al link: http://www.piramidealimentare.it/files_allegati/piramide.pdf
- 12) United States Department of Agriculture (USDA) Center for Nutrition Policy and Promotion. A brief history of USDA food guides. Giugno 2011. Disponibile al link: <http://www.choosemyplate.gov/food-groups/downloads/MyPlate/ABriefHistoryOfUSDAFoodGuides.pdf>
- 13) FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission (1999). Guidelines for the production, processing, labeling and marketing of organically produced foods. <http://www.fao.org/organicag/doc/glorganicfinal.pdf>
- 14) www.federbio.it

Capitolo 6
**VEGETALI E MUFFE: IL PROBLEMA DELLE MICOTOSSINE
E MICOTOSSICOSI IN VETERINARIA**

PAOLA MASSI¹, GIOVANNI TOSI²

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione di Forlì

¹ paola.massi@izsler.it

² giovanni.tosi@izsler.it

INTRODUZIONE

Con il termine di funghi si intende un ampio gruppo di organismi viventi appartenenti al regno *Mycetae*. Non producono clorofilla e sono perciò saprofiti o parassiti. I funghi esistono in varie forme. Alcuni sono costituiti da una singola cellula, altri sono composti da filamenti (ife) organizzate in un micelio. La riproduzione dei funghi può avvenire in forma sessuata o asessuata (attraverso la produzione di spore). Sono ubiquitari in natura e si sviluppano su sostanza organica presente nel terreno, sulle piante o nell'acqua. I funghi che causano problemi nelle derrate alimentari appartengono ai deuteromiceti (*Fungi imperfecti*) e vengono comunemente chiamati muffe. Queste ultime producono una serie di composti indispensabili per la loro sopravvivenza (metaboliti primari) e altri, detti metaboliti secondari, che svolgono funzioni anti-batteriche (antibiotici), repellenti e tossiche (micotossine). Le patologie umane ed animali causate dall'ingestione di alimenti contenenti micotossine sono chiamate micotossicosi. Il problema micotossine coinvolge tutta la filiera agronomica e zootecnica e, per questo motivo, si può verificare sia in campo che durante la fase di stoccaggio delle materie prime e dei mangimi finiti.

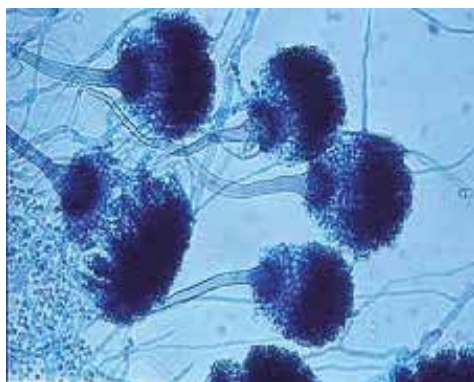
CENNI STORICI

Dal punto di vista storico esistono fondati sospetti che le patologie collegate alle muffe e alle micotossine da esse prodotte fossero note fin dall'antichità. Ad esempio nei manoscritti del Mar Morto (datati tra il 150 a.C. e il 70 d.C.) si fa riferimento alle cosiddette "case di muffa" come luoghi di malattia. Nel medioevo il "fuoco di S. Antonio" venne attribuito al consumo di cereali contaminati da muffe del genere *Claviceps* (comunemente chiamate "ergot" da cui deriva il termine "ergotismo" che definisce la malattia da esse prodotta). Il fuoco di S. Antonio (detto anche "fuoco sacro" o "male degli ardenti") probabilmente includeva anche l'infezione da *Herpes Zoster* che in alcuni sintomi coincideva con l'intossicazione da "ergot".

Si ritiene che gli alcaloidi prodotti da queste muffe, in grado di provocare lesioni gangrenose e forme convulsive, siano stati la causa di numerosi fenomeni di allucinazione descritti nei secoli scorsi. Uno dei più famosi è la "caccia alle streghe" avvenuta a Salem, nel Massachusetts (USA) alla fine del 1600, dietro la quale vi fu probabilmente il consumo di cereali contaminati da alcaloidi dell'*ergot*. In epoca moderna una delle prime segnalazioni di micotossicosi nell'uomo risale alla seconda guerra mondiale, quando soldati russi furono colpiti da una grave sindrome caratterizzata da vomito, diarrea, necrosi della mucosa orale, emorragie e distruzione del midollo osseo. La patologia, denominata "*alimentary toxic aleukia*" (ATA), fu collegata all'ingestione di frumento contaminato da muffe. Indagini retrospettive hanno individuato nella tossina T-2 (prodotta da *Fusarium sporotrichioides*) la causa di quel disastroso evento. Qualche anno prima venne descritta, sempre in Russia, una sindrome emorragica in grado di provocare elevati indici di mortalità nella specie equina. La patologia venne

chiamata stachybotryotossicosi in quanto attribuita alla contaminazione da *Stachybotris atra* (ora nota come *Stachybotris chartarum*).

Negli anni cinquanta in Nuova Zelanda una sindrome da fotosensibilizzazione provocò gravi perdite negli allevamenti ovini. La patologia si manifestava con necrosi cutanee nelle aree del corpo non coperte dal vello e venne chiamata eczema facciale. In seguito si identificò l'agente eziologico, la sporidesmina, una micotossina prodotta da *Sporidesmium bakeri*. L'avvento della moderna micotossicologia risale al 1961 con la scoperta e l'identificazione delle aflatossine in farine di arachidi somministrate a tacchini e polli in Gran Bretagna. La patologia venne inizialmente chiamata “*Turkey X disease*”.



Aspergillus spp. al microscopio e in coltura

ECOLOGIA E DIFFUSIONE DELLE MUFFE E DELLE MICOTOSSINE

Le muffe in grado di produrre micotossine appartengono a cinque generi principali: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*. Altri generi, di minore importanza, comprendono *Chaetomium*, *Diplodia*, *Myrothecium*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Pithomyces* e *Stachybotris*. Queste muffe producono svariati tipi di micotossine. Fino ad oggi se ne conoscono oltre 300. Tuttavia non tutti i ceppi di muffa sono in grado di produrre micotossine e tale sintesi avviene solo in determinate condizioni. Le micotossine di maggiore interesse per la salute umana ed animale appartengono ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e le micotossine da essi prodotte includono aflatossine, ocratossine, tricoteceni, fumonisine e zearalenone.

Ergot è invece il nome comune con il quale si definiscono le muffe appartenenti ai generi *Claviceps* e *Neotyphodium*. Il termine, che in francese significa “sperone”, descrive la tipica forma a cornetto o, appunto, a sperone assunta dagli sclerozi del fungo che contaminano la pianta (le graminacee e, in particolare, la segale), da cui deriva anche il termine di “segale cornuta”. Composti analoghi agli alcaloidi dell'*ergot* sono prodotti anche da muffe del genere *Alternaria*. Le principali micotossine, le muffe che le producono e i cereali in cui sono maggiormente presenti sono elencate nelle tabelle 1 e 2.

Tabella 1 – Principali micotossine e muffe in grado di sintetizzarle

Micotossina	Muffe
Aflatossine	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Acido ciclopiazonico	<i>A. flavus</i>
Ocratossina A	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>
Citrinina	<i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
Tossina T-2	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>
Diacetossiscirpenolo (DAS)	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>
Deossinivalenolo (DON)	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Zearalenone	<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Fumonisine	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
Acido tenuazonico	<i>Alternaria alternata</i>
Alcaloidi dell' <i>ergot</i>	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. fusiformis</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>

La *Food and Agriculture Organization* (FAO) stima che circa il 25% dei cereali prodotti nel mondo sia contaminato da micotossine. La diffusione delle micotossine varia in funzione delle condizioni climatiche. Nelle zone freddo-temperate (Canada, stati settentrionali degli USA, Europa centro-settentrionale) le micotossine maggiormente presenti sono i tricoteceni e le ocratossine. In particolare nel mais coltivato nell'Europa centro-meridionale i problemi maggiori sono riconducibili a tricoteceni e zearalenone, mentre nelle zone più fredde il rischio più elevato è rappresentato dalle ocratossine. Le aflatossine sono tipiche dei climi caldo-umidi (centro e sud America, stati meridionali degli USA, Asia, Africa). Tuttavia con la globalizzazione degli scambi commerciali la diffusione delle micotossine non è più legata a fattori climatici e geografici. In generale la contaminazione da micotossine è più elevata nei sottoprodotti della lavorazione dei cereali.

Un rischio emergente è legato al consumo di residui della distillazione dei cereali per la produzione di bio-carburanti. Da semi oleosi quali colza e girasole si ricava il bio-diesel, mentre dalla distillazione dei cereali si ottiene il bio-etanolo. Gli Stati Uniti e il Brasile stanno destinando una parte consistente della loro produzione di mais per questo scopo. Tra i sottoprodotti della distillazione vi sono i cosiddetti DDGS (“*dried distiller grains with solubles*”) che possono essere destinati all'alimentazione zootecnica. Recenti ricerche hanno dimostrato che le micotossine tendono a concentrarsi di 2-3 volte rispetto ai livelli della materia prima di partenza.

Tabella 2 – Principali micotossine presenti nei cereali in fase di pre- o di post- raccolto

Cereale	Pre-raccolto	Post-raccolto
Mais	DON, fumonisine, zearalenone	Aflatossine, zearalenone
Frumento	DON, nivalenolo, Zearalenone, alcaloidi dell' <i>ergot</i>	Ocratossine, aflatossine, citrinina
Orzo	DON, nivalenolo, zearalenone, tossina T-2, tossina HT-2	Ocratossine, aflatossine, citrinina
Avena	DON, nivalenolo, tossina T-2, tossina HT-2	Ocratossine, citrinina
Riso	//	Aflatossine, ocratossine
Sorgo	Alcaloidi dell' <i>ergot</i>	Aflatossine
Segale	Alcaloidi dell' <i>ergot</i>	Ocratossine

Le muffe sono normalmente presenti sulla pianta e nelle materie prime, ma la produzione di micotossine dipende da svariati fattori, quali il tipo di muffa, le pratiche agronomiche e le condizioni di raccolta, lavorazione e stoccaggio. La quantità di micotossine prodotta è a sua volta legata a fattori fisici (umidità del substrato e ambientale, temperatura, danni meccanici), biologici (varietà coltivate, eventi stressanti, infestazione da insetti) e chimici (livelli di anidride carbonica, ossigeno, composizione del substrato, impiego di pesticidi e fungicidi). Temperatura e umidità sono i fattori che maggiormente condizionano lo sviluppo delle muffe e la sintesi di micotossine. Sebbene l'attività dell'acqua (A_w) rappresenti il parametro migliore per valutare la disponibilità di acqua per lo sviluppo dei microrganismi, è spesso più pratico parlare di livello di umidità del substrato. I funghi patogeni richiedono in genere tenori di umidità elevati in campo (20-25%) e minori in fase di stoccaggio (13-18%).

L'accumulo di micotossine sia prima che dopo la raccolta è fortemente condizionato dalle condizioni climatiche. Il genere *Fusarium* produce micotossine soprattutto in presenza di elevati livelli di umidità in coincidenza del periodo di raccolta. La sintesi di aflatossine nella fase di pre-raccolta di arachidi e mais è invece favorita da alte temperature, danni provocati da insetti e periodi siccitosi. Inoltre le muffe del genere *Aspergillus* possono tollerare livelli di attività dell'acqua inferiori rispetto a quelle del genere *Fusarium* e, per questo motivo, possono moltiplicare sia in fase di pre- che di post-raccolta, mentre i *Fusarium* proliferano soprattutto in campo.

Lo stoccaggio delle materie prime rappresenta un evento dinamico in cui si verificano fenomeni biologici quali l'infestazione da insetti e lo sviluppo di batteri e, appunto, di muffe. Tali fenomeni sono condizionati da fenomeni fisici e, in particolare, da temperatura e umidità. Quest'ultima dipende a sua volta dal contenuto di acqua al momento della raccolta e dalle operazioni di essiccazione e aerazione attuate durante la conservazione. Oltre all'umidità "intrinseca" della materia prima, durante la fase di stoccaggio si può verificare un'ulteriore produzione di umidità, che può derivare da infiltrazioni di acqua dall'esterno oppure da fenomeni di condensazione. Questi ultimi dipendono soprattutto da due fattori:

1. Temperatura del substrato: la massa di prodotto si raffredda con una velocità diversa tra il centro e la periferia; si viene così a creare un gradiente di temperatura che può concentrare l'umidità in determinati punti della massa.
2. I processi metabolici legati allo sviluppo microbico e alla moltiplicazione degli insetti possono creare umidità e favorire fenomeni di condensazione in determinati punti del prodotto stoccato.

In entrambi i casi si possono così formare delle zone di maggiore concentrazione di umidità e, di conseguenza, di maggior rischio di moltiplicazione di muffe e di produzione di micotossine (i cosiddetti "hot spots"). È per questo motivo che la contaminazione da muffe e da micotossine non è mai uniforme nella massa della materia prima o del mangime finito. Ciò rende particolarmente difficile la rilevazione delle micotossine se non mediante un accurato campionamento.

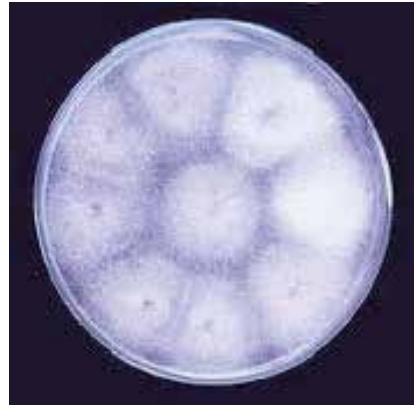
In generale si ritiene che i livelli minimi di umidità per la moltiplicazione delle muffe siano di 7-15% (umidità del substrato) e di 80-85% (umidità relativa ambientale). Le temperature che consentono la sintesi delle micotossine oscillano tra 0 e 35°C in funzione del tipo di muffa e di tossina. Ad esempio, le condizioni ottimali di sviluppo delle aflatossine sono, per le materie prime, 24-35°C di temperatura, 80-85% di umidità relativa dell'ambiente e 17% di umidità del substrato. Nel mangime finito queste condizioni variano nel modo seguente: 19-27°C, 10-13% di umidità del substrato e 79-89% di umidità relativa. Le ocratossine si formano a temperature comprese tra 4° e 37°C (con un'umidità minima del substrato del 18,5%), i tricoteceni tra 6° e 24°C.



Alternaria spp. al microscopio e in coltura

È quindi importante sottolineare che la produzione di micotossine non è correlata alla biomassa fungina presente nell'alimento e che le condizioni necessarie alla moltiplicazione delle muffe e alla sintesi delle micotossine possono variare notevolmente tra le differenti specie di muffa. Inoltre le micotossine sono molto più resistenti agli agenti esterni rispetto alle muffe che le hanno prodotte. Si può pertanto riscontrare la presenza di micotossine in assenza di muffe.

Va inoltre ricordato che non tutti i ceppi di muffa sono in grado di sintetizzare micotossine oppure le producono ma solo in determinate condizioni. Esistono infine ceppi di muffa in grado di produrre più di una micotossina, mentre la stessa micotossina può essere sintetizzata da muffe appartenenti a generi diversi (ad esempio le ocratossine e l'acido ciclopiazonico possono essere prodotte sia da muffe del genere *Aspergillus* che da muffe del genere *Penicillium*).



Fusarium spp. al microscopio e in coltura

MICOTOSSINE COME CAUSA DI MALATTIA

Le numerose micotossine finora conosciute (oltre 300) hanno strutture chimiche e meccanismi d'azione diversi tra loro. Di conseguenza anche i quadri clinici da esse causati sono alquanto diversificati. I livelli di tossicità dipendono da numerosi fattori:

- Tipo di micotossina presente nell'alimento.
- Contaminazioni multiple da più micotossine che possono avere un effetto additivo o, in certi casi, sinergico.
- Livello di contaminazione. Fatta eccezione per le DL₅₀ (che esprimono livelli di tossicità acuta) (TABELLA 3) non è possibile stabilire con precisione quali siano le concentrazioni di micotossine in grado di causare quadri patologici e problemi produttivi in allevamento. La letteratura scientifica è ricca di studi sperimentali sull'argomento. Tuttavia in queste prove vengono di solito impiegate concentrazioni molto elevate di singole micotossine purificate che non rispecchiano la realtà di campo. Altri approcci sperimentali prevedono la contaminazione dell'alimento con colture di muffe tossigene. In questi casi la contemporanea presenza di più micotossine e le interazioni tra i metaboliti fungini e i componenti nutritivi della razione possono influenzare i risultati della prova rendendo impossibile stabilire relazioni dose-effetto per le singole micotossine studiate. I risultati di queste prove devono perciò essere valutati con prudenza, considerando:
 - Durata dell'assunzione dell'alimento contaminato.
 - Specie animale (ad esempio, nelle specie aviari, in ordine decrescente: anatra, tacchino, oca, faraona, fagiano, pollo e quaglia).
 - Età (i soggetti giovani sono più sensibili all'azione immunodepressiva delle micotossine).
 - Sesso (le femmine hanno una sensibilità superiore rispetto ai maschi).
 - Stato ormonale e nutrizionale.
 - Malattie concomitanti.
 - Composizione quali-quantitativa della microflora intestinale che, in alcuni casi, può modificare la tossicità delle micotossine.

Tabella 3 – DL50* di alcune micotossine nelle specie aviari

Micotossine	DL50 (ppm)	Animale-test (età)
aflatossina B1	0,3-0,5 6,5-16,5	Anatra Pollo
Ocratossina A	0,5 2,1 3,3-3,9 4,6	Anatra (3 giorni) Broiler (1 giorno) Pollastre (giorno) Tacchini (1 giorno)
Tossina T-2	4-5,2	Broiler (1 giorno)
Tossina HT-2	7,2	Broiler (1 giorno)
Deossinivalenolo (DON)	140	Broiler (1 giorno)
Diacetoxyscirpenolo (DAS)	3,8-5,9	Broiler (1 giorno)
Moniliformina	4	Broiler (1 giorno)

* Concentrazione che, dopo un'unica somministrazione per via orale, provoca la morte del 50% degli animali-test.

Uno degli aspetti di maggiore interesse della tossicità delle micotossine riguarda la loro capacità di interagire con il DNA. Di conseguenza alcune micotossine possiedono un'attività cancerogena (fumonisine), cancerogena e teratogena/embriotossica (ocratossina A), cancerogena, teratogena/embriotossica e mutagena (aflatossina B1). Questi effetti molecolari sono di

particolare importanza, in campo umano, per quelle popolazioni che hanno una limitata possibilità di scelta dal punto di vista alimentare e che, per questo motivo, sono soggette all'assunzione di bassi livelli di micotossine protratti però per lunghi periodi di tempo.

Nel settore zootecnico, in funzione dei fattori sopra descritti, le micotossine possono provocare malattie acute caratterizzate da segni clinici, lesioni anatomico-patologiche e mortalità oppure, nella maggior parte dei casi, da sindromi croniche scarsamente o del tutto asintomatiche, ma con significativi riflessi sulla produttività. A complicare ulteriormente l'approccio diagnostico occorre ricordare che raramente le micotossine provocano quadri clinici e anatomico-patologici patognomonicamente. Ciò perché nella maggior parte dei casi le micotossicosi osservate sono il risultato di un'assunzione prolungata nel tempo di più micotossine con effetti spesso diversificati tra loro. La contaminazione multipla può avere effetti additivi o, in alcuni casi, sinergici.

Le principali patologie causate da micotossine negli animali domestici sono riassunte nella tabella 4:

Tabella 4 – Principali patologie collegate all'assunzione di micotossine

Micotossicosi	Specie animale	Micotossina	Muffa
Aflatossicosi	Specie aviari, cane	Aflatossine	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Nefropatie	Suino, specie aviari, cane	Ocratossina A	<i>Penicillium verrucosum</i>
Ergotismo	Suino, specie aviari	Alcaloidi dell' <i>ergot</i>	<i>Claviceps spp.</i>
Fusariotossicosi	Suino, specie aviari	Tricoteceni	<i>Fusarium spp.</i>
Iperestrogenismo	Suino	Zearalenone	<i>Fusarium graminearum</i>
Leucoencefalomalacia equina	Cavallo, mulo	Fumonisine	<i>F. verticilloides</i>
Edema polmonare	Suino	Fumonisine	<i>F. verticilloides</i>
Discondroplasia tibiale	Specie aviari	Fusarocromanone	<i>F. equiseti</i>
Sindrome emorragica	Suino	Wortmannina	<i>F. torulosum</i>
Stachibotriotossicosi	Cavallo, suino, specie aviari	Satratossina, verrucarina, roridina	<i>Stachybotris atra</i>

TOSSICOLOGIA DELLE PRINCIPALI MICOTOSSINE

Aflatossine

Rappresentano il gruppo di micotossine più studiato soprattutto per la loro attività cancerogena, teratogena e mutagena. Esistono 18 diversi tipi di aflatossine, ma le più diffuse sono le seguenti: B1, B2, G1 e G2. Le sigle B e G derivano dalla loro reazione colorimetrica (blu e verde rispettivamente) alla luce ultravioletta. L'aflatossina B1 è la più tossica, soprattutto a livello epatico, in tutte le specie animali. La cronica assunzione di aflatossina B1 può causare neoplasie a carico di fegato (prevalentemente), colecisti, pancreas, vie urinarie e midollo osseo. La IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha inserito l'aflatossina B1 nella classe 1 delle sostanze cancerogene per l'uomo.

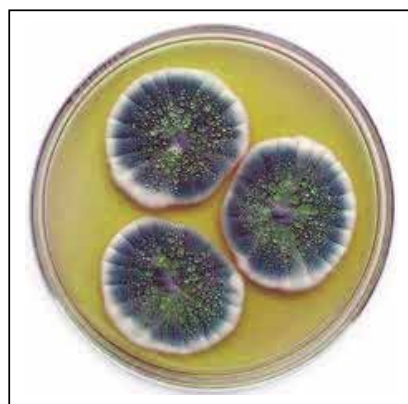
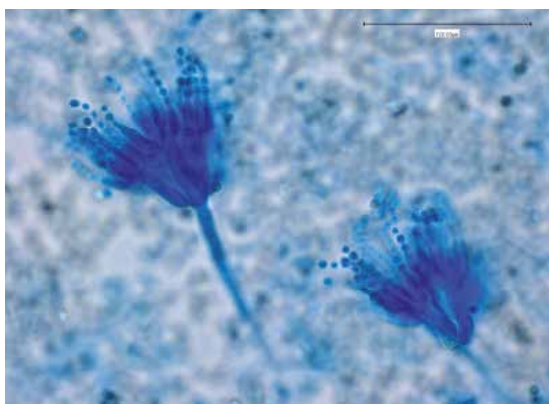
Nell'organismo animale l'aflatossina B1 viene metabolizzata mediante due diversi tipi di reazioni chimiche: la fase 1 (reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi) e la successiva fase 2, attraverso la quale i composti prodotti in precedenza vengono coniugati con moleco-

le endogene (aminoacidi, acido glucuronico, solfati ecc.) in modo da favorirne l'escrezione. Con la fase 1 si producono metaboliti idrosolubili più o meno tossici, tra i quali M1, Q1, P1 e aflatossicolo (R0). Una reazione chimica fondamentale nella bio-trasformazione della B1 è l'epossidazione, mediante la quale si produce la B1-8,9 epossido, che si presume essere responsabile dell'azione cancerogena e mutagenica della B1.

L'efficienza dei sistemi enzimatici coinvolti nei processi di bio-trasformazione ed escrezione è alla base della differente sensibilità delle specie animali nei confronti delle aflatossine. Ad esempio, tra le specie aviari, l'anatra è quella maggiormente sensibile, seguita da tacchino, oca, fagiano, quaglia, *broiler* e gallina ovaioia.

Gli effetti sul metabolismo animale sono svariati. Il principale organo bersaglio è il fegato. La tossicosi provoca dapprima una riduzione del peso di questo organo che, in seguito, si presenta aumentato di volume, pallido e friabile a causa dell'accumulo di lipidi (steatosi epatica). Il quadro isto-patologico comprende steatosi e necrosi epatica e iperplasia dei dotti biliari.

Dal punto di vista biochimico il danno epatico si traduce nell'aumento della concentrazione ematica di alcuni enzimi (SGPT, SGOT, GGT). Possono essere colpiti anche i reni (che appaiono pallidi, congesti e ipetrofici) e la milza (che si presenta aumentata di volume e di consistenza ridotta). Altri effetti tossici riguardano la fragilità capillare e la riduzione dei livelli di protrombina e si traducono in lesioni emorragiche a livello muscolare. evidenti in fase di macellazione ("bruising").



Penicillium spp. al microscopio e in coltura

Tricoteceni

Comprendono un vasto gruppo di oltre 170 micotossine, la maggior parte delle quali viene isolata da muffe del genere *Fusarium*. Chimicamente i tricoteceni si dividono in due gruppi: macrociclici e non macrociclici. Questi ultimi sono i più importanti e si dividono in due sottogruppi: il tipo A (che comprende T-2, HT-2, DAS) e il tipo B (deossinivalenolo, meglio conosciuto come vomitossina o DON, 15-acetil-DON, nivalenolo, fusarenone).

Il suino è particolarmente sensibile agli effetti tossici del DON, mentre nelle specie aviari particolare importanza rivestono le tossine T-2 e HT-2. Livelli di DON di 2-5 ppm (mg/kg) provocano nel suino rifiuto dell'alimento, mentre concentrazioni superiori (>20 ppm) inducono fenomeni emetici. Questi effetti tossici sembrano collegati ad uno squilibrio neuro-chimico cerebrale. A livello cellulare il principale effetto tossico dei tricoteceni (e, in particolare, delle tossine T-2 e HT-2) consiste nella inibizione della sintesi delle proteine e, in un secon-

do momento, degli acidi nucleici. Ciò influenza negativamente la moltiplicazione cellulare di vari tessuti: mucosa orale e gastro-intestinale, cute, cellule della serie linfoide ed eritrocitaria.

L'azione tossica si traduce in lesioni necrotiche a carico dei tessuti con i quali i tricoteceni vengono a contatto. I tricoteceni vengono rapidamente metabolizzati soprattutto grazie a reazioni di de-epossidazione da parte della microflora intestinale. Nel rumine i tricoteceni vengono detossificati dalla flora batterica e questo spiega la scarsa tossicità di questo gruppo di micotossine nei ruminanti. Per lo stesso motivo non vi sono evidenze circa il loro accumulo nei tessuti animali o il loro passaggio nel latte.



Lesione necrotica al cavo orale da tricoteceni



Necrosi della punta della lingua da tricoteceni

Nel pollo i tricoteceni possono causare la formazione di placche bianco-giallastre di consistenza caseosa al margine del becco e sulla mucosa orale. Si tratta di lesioni indicative ma non patognomoniche. La diagnosi differenziale va fatta, in questi casi, con candidiasi, ipovitaminosi A, intossicazione da solfato di rame e da composti quaternari di ammonio. A livello sperimentale lesioni orali sono state riprodotte, in *broiler* di 1 giorno, somministrando 100 ppb di tossina T-2 (dopo 35 giorni di somministrazione) e 200 ppb di DAS (dopo 10 giorni). I tricoteceni possono inoltre causare riduzione degli indici di crescita, alterazioni del piumaggio, regressione della borsa di Fabrizio (con conseguente immunodepressione) e anemia.

Nella gallina ovaioia, oltre alle lesioni orali, i tricoteceni provocano erosioni e ulcere del ventriglio. Nei casi più gravi si osserva la presenza di sangue digerito (melena) negli stomaci e nell'ingluvie. Un quadro patologico simile (chiamato "*black vomit*") è legato al consumo di farine di origine animale ed è causato dall'azione tossica di amine biogene.

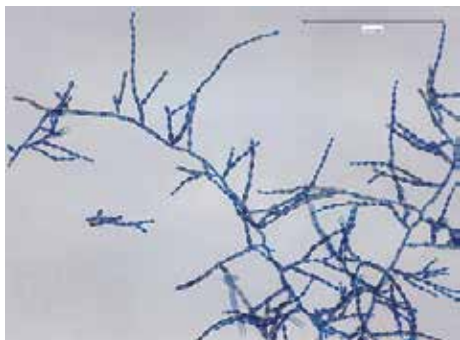
Zearalenone

Prodotto principalmente da *Fusarium graminearum* (stadio sessuato di *Gibberella zeae*), lo zearalenone è un estrogeno non-steroidale e i suoi principali metaboliti, α -zearalenolo e β -zearalenolo, possiedono una spiccata attività estrogenica grazie alla loro particolare affinità con i recettori estrogenici di fegato, utero, ghiandola mammaria e ipotalamo. Il suino è la specie più sensibile agli effetti dello zearalenone, mentre le specie avicole appaiono relativamente resistenti; è stato infatti osservato che solo concentrazioni molto elevate (800 ppm per 7-14 giorni) di questa micotossina possono causare ipertrofia dell'ovidutto e aumento dei caratteri sessuali secondari in riproduttori di pollo e tacchino. Ricerche condotte in Nuova Zelanda hanno evidenziato come questa micotossina possa essere presente anche in alcune specie foraggere e rappresentare perciò un rischio per animali al pascolo, tra cui ovini ed equini.

Fumonisine

Isolate per la prima volta nel 1988 in Sud Africa con il nome di "macrofusine", questi composti vengono prodotti soprattutto da colture di *Fusarium verticilloides* (un tempo chiamato *Fusarium moniliforme*). Comprendono dodici diversi metaboliti, tra i quali la fumonisina B1 è quella maggiormente studiata. La tossicità delle fumonisine è legata alla loro capacità di interferire con il metabolismo degli sfingolipidi attraverso l'inibizione dell'enzima ceramide sintetasi (responsabile dell'acilazione di sfinganina e sfingosina, normali costituenti delle membrane cellulari). L'accumulo di sfinganina determina una serie di reazioni a cascata, che possono causare tossicità (soprattutto a carico del sistema nervoso centrale, del fegato e dei reni) e cancerogenesi. In alcune specie animali le fumonisine provocano patologie ben definite (leucoencefalomalacia nel cavallo, edema polmonare nel suino), mentre in altre specie queste micotossine causano quadri clinici piuttosto generici: enteriti, riduzione dei parametri produttivi, immunodepressione.

I dati sperimentali finora ottenuti riguardano soprattutto contaminazioni artificiali dell'alimento con colture di *F. verticilloides* e possono pertanto risentire dell'effetto di altre micotossine. Da queste prove emergono comunque livelli tossici ben al di sopra di quelli solitamente rilevabili nelle materie prime e nei mangimi. Ad esempio, è stato osservato che concentrazioni di 75 ppm (per 3 settimane) sono in grado di alterare, nel *broiler*, i livelli serici di sfingosina e il rapporto sfinganina:sfingosina. In una prova analoga non sono stati osservati effetti sulle *performances* produttive in seguito alla somministrazione di 80 ppm di fumonisina B1 purificata. Livelli tossici più bassi sono stati descritti solo in una prova sperimentale e riguardano la somministrazione di 10 ppm di fumonisina B1 purificata per 6 giorni.



Cladosporium spp. al microscopio e in coltura

Ocratossine

Questo gruppo di micotossine, prodotto da muffe del genere *Aspergillus* e *Penicillium* è composto da sette metaboliti. Tuttavia solo l'ocratossina A è largamente diffusa in natura. I suoi bassi livelli di DL50 la indicano come la più potente tra le micotossine finora conosciute. Il suo principale organo bersaglio è il rene. I primi studi su questa micotossina furono infatti collegati alle nefropatie del suino.

In seguito l'ocratossina A è stata associata a patologie umane, tra cui la nefropatia endemica dei Balcani (diffusa in passato nella ex-Yugoslavia), la nefropatia cronica interstiziale del Nord Africa e alcuni tumori renali. L'ocratossina A è genotossica (da cui deriva l'effetto cancerogeno), tuttavia il suo meccanismo patogenetico non è mai stato completamente chiarito; essa probabilmente agisce interferendo con la sintesi di proteine e acidi nucleici e con il metabolismo glucidico renale. La sua azione tossica provoca lesioni a carico dell'epitelio dei tubuli prossimali renali, riduzione dell'assorbimento di elettroliti, aumento dell'escrezione di acqua per diuresi osmotica.

Le ocratossine vengono rapidamente metabolizzate dalla flora ruminale in ocratossina α e fenilalanina e, per questo motivo, rivestono un'importanza marginale nei ruminanti.

Alcaloidi dell'ergot

Comprendono in gruppo di molecole prodotte principalmente da muffe del genere *Claviceps* (*C. purpurea*, *C. fusiformis* e *C. paspali*). A questo gruppo appartiene anche l'ergovalina, una ergot-peptina prodotta dal genere *Neotyphodium* (che contamina soprattutto la festuca) e responsabile, negli USA, di sindromi tossiche in animali al pascolo. A seconda del tipo di alcaloide coinvolto e dei livelli di assunzione gli effetti di queste tossine possono essere di tipo circolatorio (vasocostrizione spesso associata a minore tolleranza al calore, necrosi e gangrena delle estremità), neuroendocrino (aborto, agalassia) e neurologico (fenomeni convulsivi, allucinazioni).

L'assorbimento e il metabolismo degli alcaloidi dell'ergot è differente tra ruminanti e non-



Necrosi della cresta da alcaloidi dell'ergot

ruminanti. Esistono alcaloidi idrosolubili (facilmente assorbibili dalla mucosa intestinale) e altri liposolubili (scarsamente assorbibili). La flora ruminale svolge un ruolo importante nella solubilizzazione di questi ultimi aumentandone la disponibilità intestinale.

MICOTOSSINE E PRODUZIONI ANIMALI

Effetti sugli indici di crescita

Uno dei principali effetti collegati all'assunzione di micotossine è la riduzione degli indici di crescita, che può derivare da una minore assunzione di alimento, da un'alterata utilizzazione dei principi nutritivi, da cambiamenti nella qualità dell'alimento o da fenomeni tossici a carico degli organi deputati al metabolismo. Questi fattori possono agire singolarmente o in associazione tra loro e spesso in fasi diverse dell'intossicazione.

Ad esempio, è stato dimostrato che la risposta iniziale all'assunzione di aflatossine consiste in un calo dell'assunzione di alimento; man mano che l'intossicazione procede nel tempo si riduce la correlazione tra ritardo di crescita e consumo di alimento, mentre prende il sopravvento l'azione tossica delle aflatossine sul metabolismo dell'animale.

Numerose micotossine provocano un rifiuto dell'alimento da parte dell'animale. Nel suino questo effetto è particolarmente evidente nell'intossicazione da deossinivalenolo (DON) e sembra legato a squilibri neurochimici a livello cerebrale a cui si possono aggiungere le lesioni a carico della mucosa dell'apparato digerente provocate dal DON e da altri tricoteceni (in particolare dalla tossina T-2 e HT-2). Anche gli alcaloidi dell'*ergot* possono condizionare negativamente il consumo di alimento. Ad esempio, è stata osservata nel pollo la capacità di selezionare un alimento privo di alcaloidi rispetto ad un alimento contaminato.

Attraverso l'applicazione di modelli matematici, alcuni Ricercatori sono riusciti a valutare gli effetti sugli indici di crescita conseguenti all'assunzione di alcune micotossine. È stato perciò stimato che per ogni aumento di 1 ppm di aflatossine si verifica un calo degli indici di crescita del 16% nel suino e del 5% nel pollo da carne. Nel DON tale riduzione è del 8% nel suino. Concentrazioni di micotossine in grado di causare una riduzione del 5% degli indici di crescita vengono stimate in 0,3 e 1 ppm di aflatossine e di 1,8 e 0,6 ppm di DON, rispettivamente nel suino e nel pollo da carne.

Le fumonisine non sembrano condizionare negativamente la crescita degli animali allevati se non in presenza di concentrazioni estremamente elevate, stimate attorno ai 250 ppm.

Numerose ricerche hanno evidenziato gli effetti negativi delle micotossine sull'utilizzazione dei principi nutritivi contenuti nell'alimento. Ad esempio, le aflatossine riducono l'attività degli enzimi pancreatici (amilasi, lipasi, tripsina) e la produzione di sali biliari con ripercussioni negative sulla digestione di amido, proteine e lipidi.

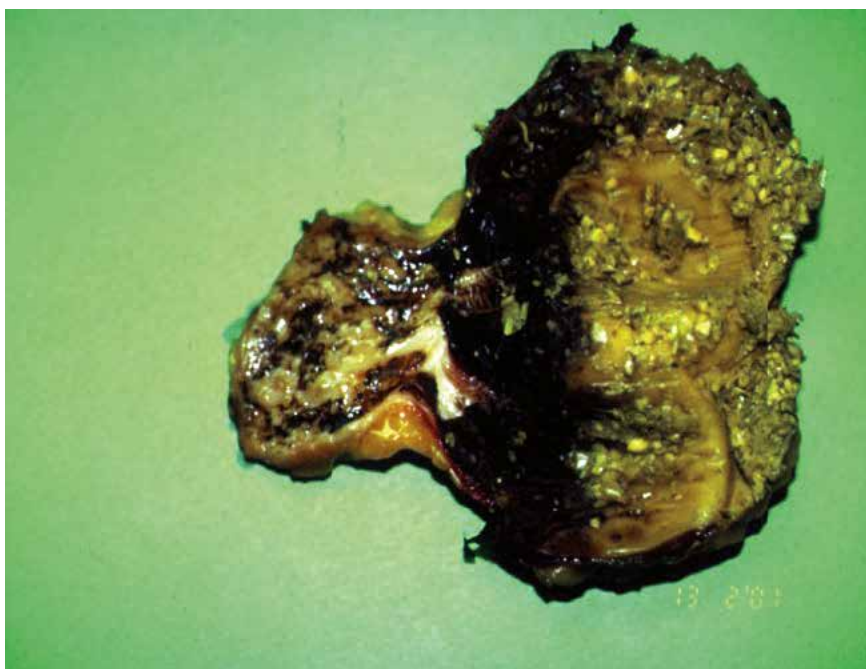
I soggetti colpiti presentano un accumulo di alimento non digerito nel lume intestinale che, a sua volta, altera la microflora intestinale favorendo la comparsa di enteriti batteriche. Le micotossine possono inoltre avere effetti sulla perossidazione dei lipidi e il metabolismo delle vitamine liposolubili.

È stato dimostrato che ocratossina A, tossina T-2 e aflatossine possono causare fenomeni di malassorbimento con conseguente calo dei livelli tissutali di alcune vitamine e di carotenoidi. Le micotossine favorirebbero lo sviluppo di radicali liberi nel lume intestinale con conseguente deplezione di fattori anti-ossidanti e comparsa di fenomeni di apoptosi che, in conclusione, determinerebbero il malassorbimento.

La produzione di radicali liberi continuerebbe anche nei tessuti-bersaglio delle micotossine, provocando fenomeni di perossidazione dei lipidi (soprattutto nel fegato) e alterazione di proteine e DNA.



Melena gastrica da tricoteceni



Melena gastrica da tricoteceni

Effetti sulla riproduzione

Gli effetti negativi delle micotossine sul metabolismo possono alterare l'efficienza riproduttiva sia nel maschio che nella femmina. Alcune micotossine possiedono inoltre un'azione embriotossica, teratogena e mutagena.

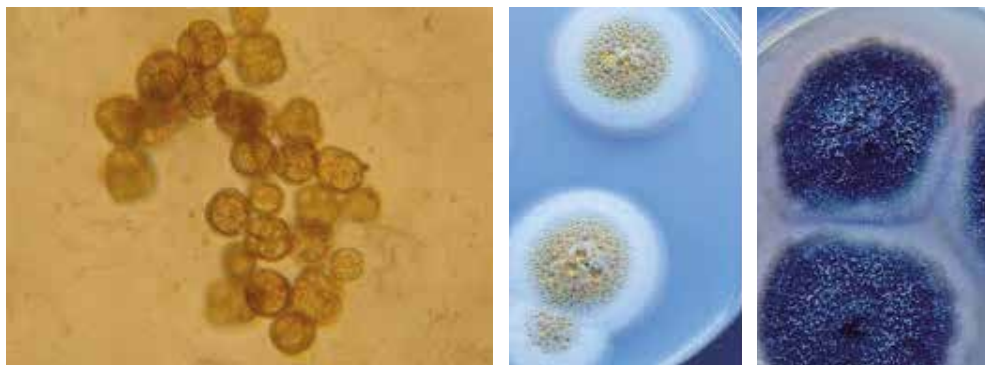
Lo zearalenone possiede un'azione diretta sull'apparato riproduttivo in quanto analogo dell'estradiolo 17B. Il suino è la specie maggiormente sensibile agli effetti dello zearaleone e la gravità di tali effetti è in relazione allo stato fisiologico dell'animale. In fase di pre-pubertà lo zearalenone può ritardare lo sviluppo sessuale, mentre nelle scrofe aumenta il rischio di aborti e mortalità neonatale. L'esposizione allo zearalenone durante la lattazione può prolungare l'intervallo svezzamento-estro e, in alcuni casi, gli animali manifestano fenomeni di estro prolungato.

Nel suino gli alcaloidi dell'*ergot* possono causare riduzione della numerosità della nidata e agalassia inibendo il rilascio di prolattina. L'alcaloide ergovalina (presente soprattutto nella festuca) può avere conseguenze importanti sulla riproduzione della specie ovina ed equina.

Nelle specie aviari sono descritti cali di deposizione a seguito dell'assunzione di alimenti contaminati da aflatossine, tossina T-2 e ocratossina A, spesso associate ad una maggiore fragilità del guscio. Esistono prove sperimentali che evidenziano effetti negativi di alcune micotossine sulla fertilità e gli indici di schiusa. In alcuni casi è stato inoltre osservato come pulcini nati da riproduttori alimentati con mangimi contaminati da micotossine siano maggiormente sensibili ad infezioni nel primo periodo di vita. Anche se poco studiato, l'acido ciclopiazonico sembra avere effetti importanti sull'efficienza riproduttiva delle specie aviari. Si tratta di una micotossina spesso associata alla contaminazione da aflatossine in quanto prodotta dagli stessi ceppi di muffa. L'acido ciclopiazonico ha effetti importanti sulla qualità del guscio, gli indici di schiusa e sulla composizione quali-quantitativa del materiale seminale maschile.

Effetti sul sistema immunitario

La maggior parte delle micotossine possiede un effetto immunodepressivo (in ordine decrescente aflatossine, tricoteceni, ocratossine e fumonisine) che si traduce in una maggiore sensibilità alle infezioni ed in una minore efficacia della vaccinazioni. È importante sottolineare che gli effetti immunodepressivi si verificano anche in presenza di livelli di micotossine inferiori rispetto a quelli in grado di provocare fenomeni di malattia o riduzione delle performance zootecniche.



Claviceps spp. al microscopio e in coltura

Le micotossine sono in grado di interferire negativamente nei riguardi di tutti i componenti del sistema immunitario. L'effetto tossico si verifica attraverso vari fenomeni tra cui i principali sembrano essere un aumento dei fenomeni di apoptosi (la cosiddetta "morte programmata" delle cellule) e di *stress* ossidativo. La tossina T-2 sembra avere, tra le micotossine finora studiate, il maggior potere nello scatenare il fenomeno dell'apoptosi. Lo *stress* ossidativo è invece causato dalla produzione di radicali liberi in grado di danneggiare le membrane cellulari dei principali mediatori del sistema immunitario.

Residui nei tessuti animali

Alcune micotossine possono essere presenti, come tali o come metaboliti, in tessuti e secrezioni destinate al consumo umano. Questa problematica riguarda essenzialmente l'aflatossina B1 e l'ocratossina A.

Nei mammiferi l'aflatossina B1 viene eliminata nel latte (in concentrazioni variabili dallo 0,3 al 6% del livello ingerito dall'animale) sottoforma del suo metabolita idrossilato M1 che, nonostante possieda un effetto tossico di almeno una grandezza inferiore rispetto alla B1, è stato anch'esso classificato come agente cancerogeno.

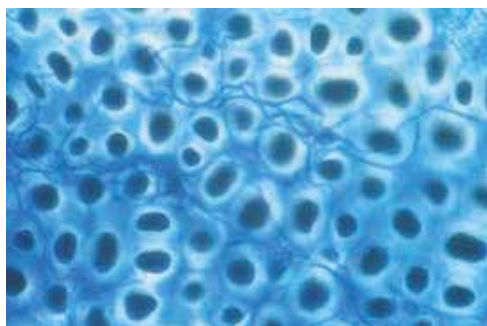
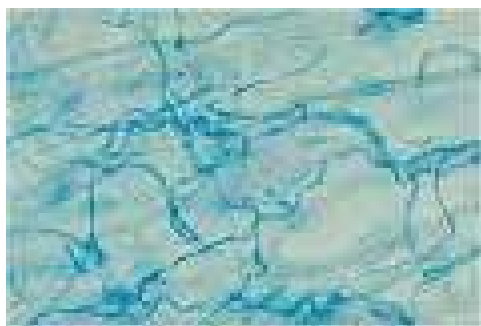
La presenza di residui di ocratossina A nelle carni può rappresentare un rischio nel suino a causa della sua prolungata emivita nei tessuti animali (140-180 ore rispetto alle 4 ore del pollo).

Non vi sono evidenze circa la possibilità di accumulo di altre micotossine in alimenti animali destinati al consumo umano.

DIAGNOSI DI MICOTOSSICOSI

Il sospetto diagnostico di micotossicosi scaturisce dall'osservazione dei segni clinici e delle lesioni anatomo-patologiche. È importante correlare tale osservazione con l'esame dei dati produttivi e con l'esclusione di altri tipi di patologia. In linea generale si può ipotizzare una micotossicosi quando vengono soddisfatte le seguenti condizioni:

- La causa della malattia non è rapidamente identificabile.
- La patologia osservata non appare trasmissibile.
- La patologia sembra correlata ad un particolare lotto di mangime.
- I trattamenti antibiotici non sono efficaci.
- La sindrome osservata può avere un'incidenza stagionale oppure essere collegata a determinate condizioni climatiche.



Neotyphodium spp. al microscopio e in coltura

Va ricordato che le micotossine non sono immunogene e, pertanto, non producono anticorpi rilevabili con prove sierologiche. Segni clinici e lesioni macroscopiche non sono mai patognomiche. Per questo motivo il sospetto diagnostico va confermato dal rilevamento delle micotossine nell'alimento. Tuttavia non è facile ottenere un dato analitico che giustifichi il quadro patologico osservato in allevamento.

Le micotossine non sono infatti distribuite in maniera uniforme nella massa dell'alimento (contaminazione "a spot"). Un corretto campionamento è quindi fondamentale per aumentare le probabilità di rilevare quantità significative di micotossine.

Nei controlli ufficiali i criteri di campionamento sono fissati da disposizioni di legge (Regolamento CE 401/2006 e Regolamento CE 152/2009) che fissano, sulla base del peso della partita da campionare, il numero di "campioni elementari" (ossia il materiale prelevato in un solo punto della partita). Questi ultimi vengono riuniti e miscelati in "campioni globali" dai quali si ricavano, mediante macinazione, i "campioni finali" destinati al laboratorio.

Per campionamenti eseguiti nell'ambito di programmi di autocontrollo o per scopi diagnostici conviene seguire criteri analoghi. In linea generale l'alimento va prelevato in almeno 3-5 punti differenti della massa da campionare. Da ciascuno di essi vanno ricavati 8-12 campioni elementari di circa 500 grammi l'uno. I campioni elementari di ciascun punto di prelievo vanno miscelati tra di loro in modo da formare 3-5 campioni composti. Dalla miscelazione dei campioni composti si ottiene un campione finale di 500 g (per alimenti a basso tenore di umidità) o di 1kg (per alimenti con livello di umidità superiore al 12%). Il campione finale va posto in sacchetti di carta (avendo cura di sigillarli dopo aver tolto l'aria) e inviato al laboratorio in condizioni di refrigerazione.

Un altro limite alla rilevazione delle micotossine è la disponibilità di sistemi diagnostici, limitata solo ad una parte delle oltre 300 micotossine conosciute.

L'analisi di laboratorio può essere infine ostacolata dalla presenza delle cosiddette "micotossine mascherate". Le piante infestate da muffe possono legare le micotossine a zuccheri, aminoacidi e solfati, rendendole inattive e non rilevabili dai sistemi diagnostici. Una volta ingerite, la flora intestinale dell'ospite può scindere questi legami chimici, provocando la riattivazione delle micotossine. Finora si conoscono lo zearalenone-4-glucoside e il DON-3-glucoside, ma non si esclude l'esistenza di strategie simili anche per altre micotossine.

I valori di riferimento previsti dalla normativa vigente sono riportati nella tabella 5:

Tabella 5 – Valori di riferimento delle micotossine negli alimenti zootecnici

Micotossina e fonte normativa	Alimento	Valore di riferimento*
Aflatossina B1 Direttiva 2002/32	<i>Materie prime per mangimi</i>	0,02
	<i>Mangimi complementari e completi ad eccezione di:</i>	0,01
	- Mangimi composti per bovini e vitelli, ovini da latte e agnelli, caprini da latte e capretti, suinetti e pollame giovane	0,005
	- Altri mangimi composti per bovini, ovini, caprini, suini e pollame	0,02
Deossinivalenolo (DON) Raccomandazione CE 2006/576/CE	<i>Materie prime per mangimi:</i>	
	- Cereali e prodotti a base di cereali, eccetto i sottoprodotti del granoturco	8
	- Sottoprodotti del granoturco	12
	<i>Mangimi complementari e completi ad eccezione di:</i>	5
	- Mangimi complementari e completi per suini	0,9
	- Mangimi complementari e completi per vitelli (<4mesi), agnelli e capretti	2

Micotossina e fonte normativa	Alimento	Valore di riferimento*
Zearalenone Raccomandazione CE 2006/576/CE	<i>Materie prime per mangimi:</i>	
	- Cereali e prodotti a base di cereali, eccetto i sottoprodotti del granoturco	2
	- Sottoprodotti del granoturco	3
	<i>Mangimi complementari e completi:</i>	
	- Per suini e scrofette (giovani scrofe)	0,1
	- Per scrofe e suini da ingrasso	0,25
Ocratossina A Raccomandazione CE 2006/576/CE e DM 15 maggio 2006	- Per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi gli agnelli), caprini (inclusi i capretti)	0,5
	<i>Materie prime per mangimi:</i>	
	- Cereali e prodotti a base di cereali	0,25
	<i>Mangimi complementari e completi:</i>	
Fumonisine B1+B2 Raccomandazione CE 2006/576/CE	- Per suini	0,05
	- Per pollame	0,10
	<i>Materie prime per mangimi:</i>	
	- Granoturco e prodotti derivati	60
	<i>Mangimi complementari e completi:</i>	
	- Per equini, suini, conigli e animali da compagnia	5
	- Per pesci	10
	- Per pollame, vitelli (<4mesi), agnelli e capretti	20
	- Per ruminanti adulti e visoni	50

* In mg/kg (ppm) al tasso di umidità del 12%.

PROVE DI LABORATORIO

Determinazione della carica micotica nell'alimento: si basa sull'isolamento e il conteggio delle muffe su appositi terreni colturali. Un'elevata carica micotica è un indicatore della probabile (ma non certa) presenza di micotossine e rappresenta essa stessa un problema in quanto riduce la palatabilità e quindi l'assunzione dell'alimento. Non esistono tuttavia livelli minimi di contaminazione per poter giudicare come "a rischio" l'alimento testato.

Determinazione di ergosterolo e chitina nell'alimento: si tratta di normali costituenti della parete cellulare delle ife fungine. Vengono rilevati mediante reazioni colorimetriche o attraverso più sofisticate tecniche cromatografiche. È un *test di screening* indicato soprattutto per i mangimi dopo trattamento termico (che riduce la vitalità e quindi la probabilità di isolamento delle muffe). Tuttavia si può prestare a risultati falsi positivi per la presenza di steroli vegetali e di chitina contenuta nell'esoscheletro di insetti.

Metodi di rilevazione delle micotossine: si basano su tecniche separative (cromatografia liquida ad alta pressione o HPLC e gas cromatografia o GC) associate a sistemi di rilevazione quali la spettrofluorometria o la spettrometria di massa (MS). Vengono precedute da fasi di estrazione e purificazione. Queste tecniche hanno il vantaggio di fornire un'informazione multianalitica, permettendo quindi di rilevare il contenuto complessivo di micotossine me-

dante una singola analisi. I limiti di queste tecniche diagnostiche sono la ridotta produttività analitica (che li rende inadatti a programmi di monitoraggio su vasta scala) e l'elevato costo della strumentazione.

La necessità di disporre di *test* più rapidi ed economici ha portato allo sviluppo di sistemi immunoenzimatici (ELISA) basati su una tecnologia ormai consolidata e facilmente ottenibili in un formato commercializzabile.

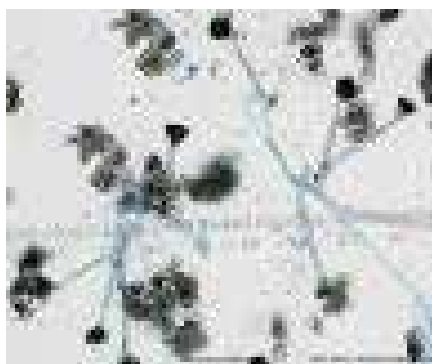
Alcuni *test* ELISA presentano un elevato livello di correlazione con le metodiche separative come l'HPLC. Questi metodi necessitano di strumentazioni poco costose. A causa della loro elevata specificità è però necessario disporre di un *test* diagnostico per ciascuna delle micotossine da ricercare. I metodi immunoenzimatici possono fornire un dato quantitativo oppure qualitativo (positività al di sopra di un determinato valore-soglia) che, soprattutto in caso di controversie di carattere commerciale, va confermato con metodiche di tipo separativo.

Un'importante applicazione, resa possibile dalla disponibilità di anticorpi specifici per le micotossine, si basa sulle colonne di immunoaffinità che permettono di estrarre, purificare e concentrare l'analita dalla matrice, migliorando il rendimento delle tecniche cromatografiche.

Indipendentemente dal tipo di *test*, ogni laboratorio deve adottare metodi diagnostici validati da organismi riconosciuti a livello internazionale. La validazione si basa su criteri di ripetibilità (lo stesso campione analizzato più volte nelle medesime condizioni deve fornire lo stesso risultato), di riproducibilità (lo stesso campione analizzato da laboratori diversi deve fornire lo stesso risultato) e di capacità di recupero dell'analita dal materiale in esame. È inoltre fondamentale eseguire frequenti controlli di qualità della prova (impiegando *standard* di riferimento certificati) e sottoporsi periodicamente a prove interlaboratorio ("*proficiency test*").

Metodi molecolari: si basano sull'individuazione, mediante metodiche quali la PCR e la *Real Time* PCR, dei geni che codificano la sintesi delle micotossine a partire da colture di muffe. Questo tipo di indagine consente di evidenziare il potenziale tossigeno delle muffe isolate dall'alimento.

Impiego di *biomarker*: consiste nel rilevare le micotossine direttamente nell'organismo animale. Lo sviluppo di *biomarker* sufficientemente attendibili è legato ad una dettagliata conoscenza della tossicologia delle micotossine. Rappresentano il futuro nella diagnosi delle micotossicosi. Finora questo tipo di approccio è stato impiegato per la rilevazione dell'esposizione alle aflatossine in alcune popolazioni umane mediante il dosaggio delle aflatossine legate alle albumine sieriche.



Stachybotrys spp. al microscopio e in coltura

STRUMENTI DI CONTROLLO

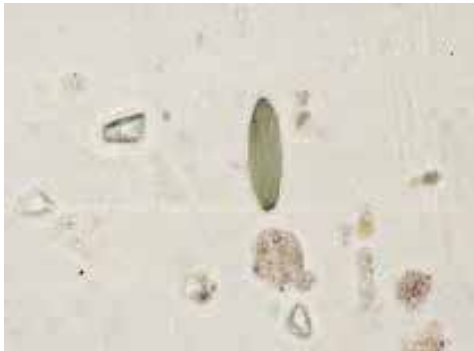
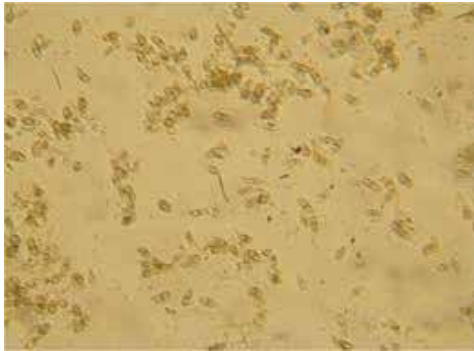
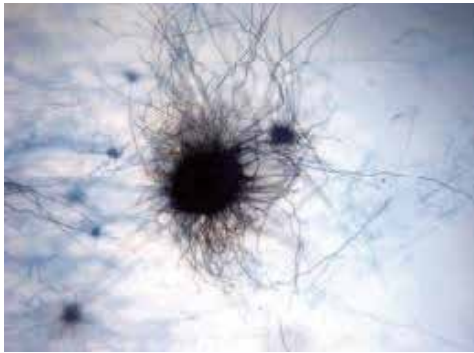
Gli interventi mirati al controllo della contaminazione fungina e alla produzione di micotossine possono essere classificati in tre aree principali di intervento:

- 1. Prevenzione in campo:** si basa sull'adozione di buone pratiche agronomiche, sull'impiego giudizioso di strumenti di lotta agli insetti infestanti e sulla selezione di *cultivar* resistenti.
- 2. Decontaminazione:** viene attuata durante la fase di stoccaggio e lavorazione delle materie prime. Prevede l'impiego di trattamenti fisici (pulizia, setacciatura, calore, irradiazione) e chimici (estrazione con solventi, ammoniaca, idrossido di sodio, agenti ossidanti e riducenti). Si tratta di sistemi di decontaminazione fortemente limitati dal costo, dagli effetti negativi sul valore nutritivo dell'alimento e, per taluni di essi, dal rischio per la salute degli operatori. In questo gruppo possono rientrare anche gli "acidificanti" costituiti da acidi grassi a corta catena (propionico, acetico, sorbico, benzoico e formico). Si tratta di sostanze ad azione fungostatica in grado di controllare la moltiplicazione delle muffe. L'attività di queste molecole è condizionata in modo negativo da valori elevati di pH e dalla presenza di materie prime ad elevato contenuto proteico. Altri limiti delle sostanze antifungine sono, nel lungo periodo, la comparsa di fenomeni di resistenza e il danneggiamento delle attrezzature.
- 3. Inattivazione:** si basa sull'impiego di additivi che agiscono nell'organismo animale. Sulla base del loro meccanismo di azione si possono ulteriormente dividere in:

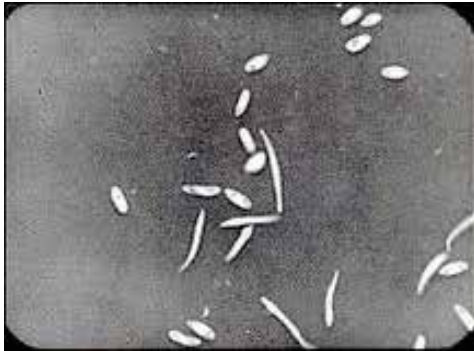
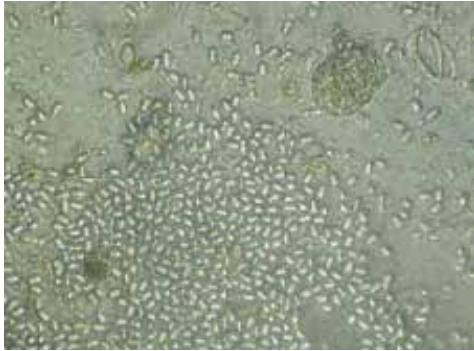
Adsorbenti: si tratta di composti inerti in grado di legare le micotossine riducendone l'assorbimento intestinale. Comprendono bentoniti, zeoliti e alluminosilicati. La loro efficacia è elevata nei confronti delle aflatossine, mentre è parziale o addirittura nulla nei riguardi delle altre micotossine. Inoltre possono ridurre l'utilizzazione di alcuni oligoelementi contenuti nella razione. Un'alternativa agli adsorbenti è costituita dai glucomannani, polisaccaridi estratti dalla parete cellulare di alcuni lieviti. Rispetto ai composti precedenti hanno uno spettro d'azione più ampio (aflatossine, zearalenone, fumonisine, alcuni tricoteceni), una maggiore selettività e un basso livello di inclusione nella razione.

Detossificanti: comprendono enzimi in grado di inattivare le micotossine. Rispetto agli adsorbenti sembrano possedere una maggiore specificità, un più ampio spettro d'azione e un effetto irreversibile. Un ulteriore passo avanti in questo settore è rappresentato dall'impiego di microrganismi in grado, attraverso i propri sistemi enzimatici, di detossificare le micotossine. Recentemente l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ha espresso un parere favorevole all'impiego di un microrganismo (denominato DSM11798) per la detossificazione dei tricoteceni nella specie suina.

Bioprotettori: prevedono l'impiego di sostanze anti-ossidanti (selenio, butilidrossitoluene, beta-naftoflavone) e di aminoacidi solforati (cistina, metionina) che mitigano lo *stress* ossidativo causato dalle micotossine e potenziano l'attività dei sistemi enzimatici impegnati nella loro detossificazione.



Muffe in grado di produrre micotossine. Generi di minore importanza. Da sinistra a destra, l'aspetto microscopico e la crescita in coltura. Dall'alto verso il basso: Chaetomium, Diplodia, Myrothecium.



Muffe in grado di produrre micotossine. Generi di minore importanza. Da sinistra a destra, l'aspetto microscopico e la crescita in coltura. Dall'alto verso il basso: Phoma, Phomopsis, Pithomyces.

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- 1) Berthiller F. et al.: *masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005, vol.53 pp.3421-3425.
- 2) Binder E.M. et al.: *worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients*. Animal Feed Science and Technology 2007, vol.137 pp.265-282.
- 3) Brase S. et al.: *chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites*. Chemical Reviews 2009, vol.109, pp.3903-4399.
- 4) Bryden W.L.: *mycotoxins in the food chain: human health implications*. Asia pacific Journal of Clinical Nutrition 2007, vol.16 (suppl.1) pp.95-101.
- 5) Bryden W.L. et al.: *mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security*. Animal Feed Science and Technology 2012, vol.173 pp.134-158.
- 6) CAST 2003: *mycotoxins: risk in plant, animal and human systems*. Report n.139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA, USA www.trilogylab.com
- 7) D'Mello J.P.F. et al.: *mycotoxins*. Animal Feed Science and Technology 1997, vol.69 pp.155-166.
- 8) Eriksen G.S. et al.: *toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed*. Animal Feed Science and Technology 2004, vol.114 pp.205-239.
- 9) Gleen A.E.: *mycotoxigenic Fusarium species in animal feed*. Animal Feed Science and Technology 2007, vol.137 pp.213-240.
- 10) Hollinger K. et al.: *mycotoxicosis in food producing animals*. Veterinary Clinics of North America: food animal practice 1999, vol.15 pp.133-164.
- 11) Krska R. et al.: *analysis of Fusarium toxins in feed*. Animal Feed Science and Technology 2007, vol.137 pp.241-264.
- 12) Magan N.: *mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies*. Mycopathologia 2006, vol.162 pp.245-253.
- 13) Richard J.L.: *some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview*. International Journal of Food Microbiology 2007, vol.119 pp.3-10.
- 14) Smith J.E.: *mycotoxins: formation, analysis and significance*, John Wiley and sons, Chichester (UK), 1985, pp.141.
- 15) Whitaker B. et al.: *sampling feeds for mycotoxin Analysis*. In The Mycotoxin Blue Book (edited by D.E.Diaz), Nottingham University Press, Nottingham (UK), 2005 pp.349, pag.1.

Capitolo 7
**IL RUOLO DEI MICRORGANISMI
IN ALCUNE PRODUZIONI DI ORIGINE VEGETALE**

SILVANO RODATO

Istituto Alberghiero IPSSAR “G. Maffioli” di Castelfranco Veneto
silvano.rodato@alice.it

Nella storia dell’umanità i primi **alimenti fermentati** sono nati quasi sicuramente per caso, ma l’uomo ha imparato rapidamente a manipolare le condizioni che favorivano le fermentazioni, sviluppando le numerose tipologie di prodotti fermentati che conosciamo oggi. Gli antichi Egizi producevano pane e vino già nel 4000 a.C. e le prime notizie storiche sulla produzione di birra in Mesopotamia risalgono al 1750 a.C.

Si stima che al giorno d’oggi circa il **20% della dieta nei Paesi sviluppati** sia composta da alimenti fermentati, mentre nei Paesi in via di sviluppo tale percentuale può arrivare a circa il 50%.

Molti alimenti di origine animale e vegetale sono facilmente deteriorabili: la crescita di microrganismi indesiderati può renderli pericolosi per la salute, alterarne le caratteristiche nutrizionali, o renderli inaccettabili da un punto di vista sensoriale, producendo alterazioni dell’aspetto, dell’odore o del sapore. Tuttavia, la crescita di alcuni microrganismi può produrre cambiamenti desiderabili: l’alimento può diventare più sicuro da un punto di vista igienico, più conservabile, sviluppare nuove proprietà sensoriali.

In un certo senso, la **fermentazione** può essere definita come un *processo di deterioramento di un alimento che produce risultati desiderabili*.

Se le condizioni sono favorevoli per il loro sviluppo, i microrganismi “buoni” crescono rapidamente e prendono il sopravvento, limitando la crescita di quelli indesiderati (patogeni, putrefacenti, etc.).

Oggi, un’enorme varietà di alimenti sono prodotti per fermentazione, cioè mediante un processo per cui un materiale grezzo subisce un cambiamento ad opera delle attività enzimatiche dei microrganismi ed acquista caratteristiche fisiche od organolettiche nuove e/o desiderabili.

Il ruolo dei microrganismi nelle fermentazioni alimentari è stato scoperto solo di recente (a partire dal 1860), ma negli ultimi 150 anni la scienza ha fatto passi da gigante nella conoscenza della tassonomia, ecologia, fisiologia e genetica dei microrganismi importanti nelle fermentazioni alimentari.

I **microrganismi** svolgono quindi ruoli diversi nella produzioni di diversi alimenti fermentati:

- produrre cambiamenti desiderabili in termini di corpo, tessitura, sapore, aroma, colore;
- rendere più facilmente utilizzabili sostanze che non lo sono;
- migliorare il valore biologico di alimenti poveri da un punto di vista nutrizionale;
- rendere alimenti deperibili più conservabili (per effetto sul pH, Eh, produzione di acidi organici e di altre sostanze antimicrobiche o per semplice competizione per i nutrienti);
- inibire lo sviluppo di germi patogeni.

Alcune fermentazioni sono da contrastare perché costituiscono un’alterazione non voluta, altre sono alla base della produzione di alimenti. Questo termine deriva dal latino **fervere** (= bollire, ribollire), dalla apparente ebollizione del mosto durante la produzione di vino.

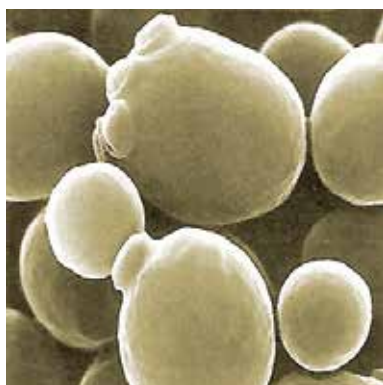
I **microrganismi** responsabili dei processi fermentativi possono essere batteri, lieviti o muffe.

Di seguito si riportano quelli più importanti per la produzione di alimenti (Fonte: “Chimica degli alimenti” - Cappelli e Vannucchi – Zanichelli).

Organismo	Tipo	Prodotto
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lievito	Lievito per panificazione, vino, birra, <i>sake</i>
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Lievito	Birra
<i>Saccharomyces rouxii</i>	Lievito	Salsa di soia
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Batterio	<i>Yogurt</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Batterio	<i>Yogurt</i>
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Batterio	Formaggio svizzero
<i>Gluconobacter suboxidans</i>	Batterio	Aceto
<i>Penicillium roqueforti</i>	Muffa	Gorgonzola, <i>Roquefort</i>
<i>Penicillium camembertii</i>	Muffa	Formaggi <i>Camembert</i> e <i>Brie</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	Muffa	<i>Sake</i>
<i>Rhizopus</i>	Muffa	<i>Tempeh</i>
<i>Mucor</i>	Muffa	<i>Tofu</i>
<i>Monascus purpurea</i>	Muffa	<i>Ang-kak</i> (riso rosso)

I **lieviti** sono una famiglia di **funghi** piuttosto complessa che comprende specie costituite da individui unicellulari, il cui corpo è una cellula tondeggiante di dimensioni 5-10 *micron*.

Sono organismi **eucarioti**, cioè le loro cellule, al pari di quelle dei vegetali e degli animali, hanno un nucleo racchiuso da una membrana e contengono più di un cromosoma; hanno inoltre organelli come per esempio i mitocondri, responsabili della produzione di energia.



Si riproducono abitualmente per **gemmazione**: una nuova cellula nasce per estroflessione da una cellula ormai matura, finché si stacca per condurre vita indipendente.

Vivono in ambienti dove vi sia disponibilità di zuccheri e sono molto importanti in alimentazione perché promuovono la **fermentazione alcolica**. Le cellule dei lieviti contengono infatti alcuni **enzimi** in grado di trasformare lo zucchero in alcol e anidride carbonica. Per tale motivo vengono impiegati nelle fermentazioni naturali e guidate di vino, birra, pane e alcune bevande a base di latte fermentato.

Tra i lieviti ricordiamo il genere *Saccharomyces* (decisamente fermentante) e il genere *Zigosaccharomyces* (con attitudini fermentanti più attenuate).

Il genere *Pichia* può essere responsabile di formazione di veli sui liquidi nutritivi. In alcuni casi i lieviti sono agenti di alterazione come bombaggio di lattine o colorazioni anomale degli alimenti.

Alcune specie sono comunemente usate per lievitare il pane e far fermentare le bevande alcoliche. La maggior parte dei lieviti appartiene al gruppo degli Ascomiceti.

Il lievito più comunemente usato è un saccaromicete, termine scientifico *Saccharomyces cerevisiae*, che è “addomesticato” da migliaia di anni per la produzione di vino, pane e birra.

Saccharomyces cerevisiae è conosciuto anche come lievito da forno o **lievito di birra**; è usato come organismo modello da biologi che studiano genetica e biologia molecolare (in particolare ciclo cellulare) perché è facile crescerlo in coltura e come **eucariota** ha una struttura cellulare complessa.

Saccharomyces cerevisiae è stato il primo **genoma** di un eucariota ad essere sequenziato completamente. Il *database* del genoma dei lieviti è uno strumento molto importante per sviluppare la conoscenza del funzionamento e organizzazione della genetica e della fisiologia delle cellule eucariote. Un altro importante *S. cerevisiae database* è mantenuto dal Centro di informazione per le sequenze proteiche di Monaco di Baviera.

Mentre alcuni lieviti utilizzano esclusivamente la respirazione aerobica, altri, in assenza di ossigeno, possono utilizzare un processo diverso chiamato fermentazione. I lieviti fermentanti producono energia convertendo gli zuccheri in anidride carbonica ed etanolo. Nella fermentazione delle bevande alcoliche è utile la produzione dell'etanolo, mentre nella lievitazione del pane l'anidride carbonica gonfia la pasta e l'alcol (etanolo) evapora durante la cottura.

I LIEVITI NELLA PRODUZIONE DEL PANE

Nella **panificazione** il lievito (del genere *Saccharomyces*) fermenta gli **oligosaccaridi** che si staccano dall'amido durante la fase di impasto e di riposo della massa in lavorazione. I prodotti della fermentazione alcolica (alcol etilico ed anidride carbonica) passano in fase gassosa formando le caratteristiche bolle durante la lievitazione e la cottura.

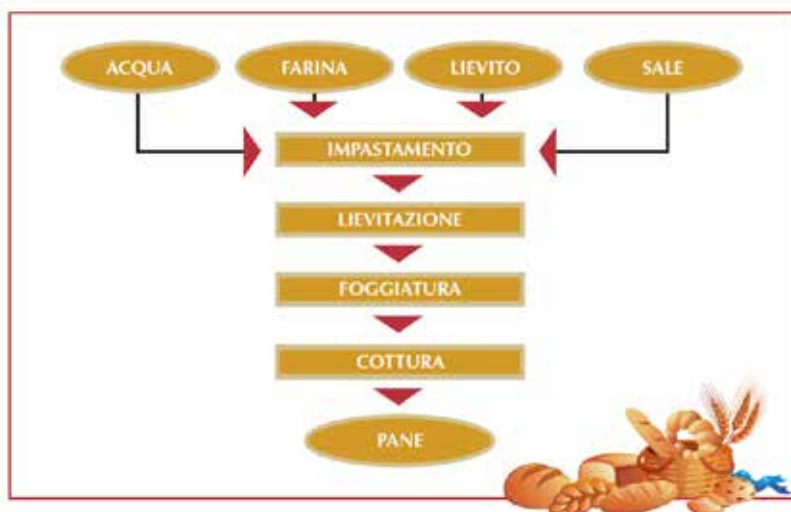
Dal punto di vista legislativo (Legge n. 580 del 4 luglio 1967), per **pane** si intende il prodotto ottenuto dalla cottura di una pasta convenientemente lievitata, preparata con sfarinati di grano, acqua e lievito, con o senza aggiunta di sale comune (cloruro di sodio).

La **farina** più idonea alla panificazione è quella di frumento di **grano tenero**, anche se è possibile panificare con farina di *grano duro*, farine di *segale* o farine di *altri cereali* miscelate con frumento. È autorizzata la produzione di **pani speciali** con l'aggiunta di grassi (olio di oliva, strutto) od altri ingredienti (latte, uvetta, sesamo, ecc.).

La **forza della farina** è legata al contenuto di gliadina e glutenina che compongono il glutine. Tale forza si misura con l'indicatore **W**:

- **170 W** (farine deboli)
- **180-260 W** (medie), pane francese;
- **280-350 W** (forti), pizza, pasta all'uovo;
- **oltre 350 W** (farine speciali), per migliorare altre farine.

L'**indicatore W** non viene utilizzato per le farine ad uso domestico, pertanto si guarda la quantità di proteine (più è elevata, migliore è l'attitudine alla panificazione).



Panificazione

Il processo della panificazione prevede le seguenti fasi:

1. Impastamento

Si esegue a mano o nelle macchine impastatrici che rimestano una miscela di farina, acqua, lievito ed eventualmente sale (in proporzioni variabili secondo il tipo di pane desiderato) fino ad ottenere un impasto tenace ed omogeneo.

Durante questa operazione le proteine *gliadina* e *glutenina* si idratano e formano il *glutine* che conferisce tenacità ed elasticità all'impasto. Il contenuto di *glutine* indica anche la tendenza alla panificazione che viene definita come "forza" delle farine.

L'acqua utilizzata, oltre ad essere potabile, deve avere un adeguato contenuto salino (media durezza). Il sale (NaCl) viene a volte aggiunto all'impasto in piccole quantità. Nel nostro Paese molti tipi di pane vengono prodotti senza questo ingrediente (es.: pane toscano, pugliese).

A livello industriale e semindustriale viene normalmente utilizzato il lievito di birra, costituito da colture di *Saccharomyces cerevisiae* e commercializzato in panetti compressi.

Può essere impiegato anche il *lievito naturale* o di *pasta acida* che viene ottenuto lasciando all'aria per un po' di tempo acqua e farina: in questo modo l'impasto si arricchisce sia di *saccaromiceti* che di microrganismi ambientali i quali acidificano l'impasto.

I **lievianti chimici** (utilizzati per pane in cassetta e biscotti) sono costituiti da bicarbonato di sodio o bicarbonato di ammonio e devono la loro azione lievitante allo sviluppo di gas (anidride carbonica).

L'impastamento può avvenire secondo:

- a) **il metodo diretto**, caratterizzato da un mescolamento dei vari ingredienti a più riprese, intervallate da fasi di riposo (alcuni minuti per favorire la formazione di *glutine*) fino al completamento dell'operazione.
- b) **il metodo indiretto**, che può essere da impasto-lievito e con lievito naturale. Nel metodo con impasto-lievito, dapprima si prepara l'impasto lievito (giuste quantità di farina, acqua, lievito) e solo dopo la lievitazione si aggiungono le ulteriori quantità di acqua, farina ed eventualmente sale. Nel metodo con lievito naturale si usa invece il lievito di pane, prelevato da un pezzo dell'impasto del giorno precedente (*lievito madre*).



2. Lievitazione

Durante questa fase l'impasto viene lasciato fermentare in camere adatte ad una temperatura ottimale di circa 25-30 °C.

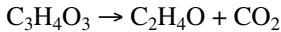
Nella **lievitazione** si verifica una complessa trasformazione a carico dell'amido della farina che viene degradato dapprima a maltosio e glucosio ad opera della *diastasi* (o *amilasi*) della farina. La *maltasi* del lievito interviene per trasformare ulteriormente il maltosio in glucosio ed infine, nel processo fermentativo, la *zimasi* del lievito trasforma il glucosio in *alcol etilico* e *anidride car-*



bonica. L'anidride carbonica essendo un gas tende ad uscire, ma viene trattenuta parzialmente dalla struttura elastica e compatta del glutine, rigonfiando e rendendo spugnoso l'impasto.

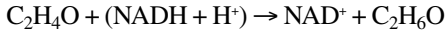
Avviene in sostanza una **fermentazione alcolica** che si può suddividere in:

- 1^a PARTE:



Acido piruvico \rightarrow *Acetaldeide* + *Anidride carbonica*

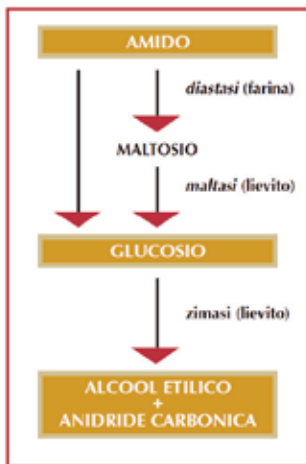
- 2^a PARTE:



Acetaldeide + *Nicotinammide adenina dinucleotide ridotto* \rightarrow *Nicotinammide adenina dinucleotide ossidato* + *Etanolo*

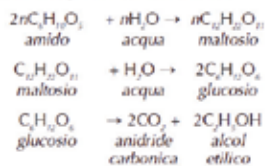


La fermentazione alcolica ha come risultato la trasformazione degli zuccheri in alcol etilico e anidride carbonica. Tale processo è alla base della produzione delle principali bevande alcoliche (vino, birra), ma anche della lievitazione del pane. Una fermentazione troppo lunga è nociva perché viene favorita la fermentazione proteolitica, diminuisce la resistenza del glutine e l'impasto perde la capacità di trattenere gas.



L'anidride carbonica essendo un gas tende ad uscire, ma viene trattenuta parzialmente dalla struttura elastica e compatta del glutine, rigonfiando e rendendo spugnoso l'impasto. Una fermentazione troppo lunga è nociva perché viene favorita la fermentazione proteolitica, diminuisce la resistenza del glutine e l'impasto perde la capacità di trattenere gas.

Le trasformazioni chimico-enzimatiche che avvengono nella lievitazione:



■ Il pane non lievitato si dice **azzimo** e viene consumato dagli Ebrei nel tempo di Pasqua.



3. Foggatura

Questa operazione, detta anche pezzatura, consiste nel tagliare in pezzi l'impasto e dare la forma desiderata al pane. Secondo i vari sistemi di panificazione può essere fatta prima o dopo la lievitazione.

4. Cottura

Questa operazione avviene in forni elettrici o riscaldati con bruciatori esterni, più raramente in forni a legna, alle temperature di 230-270 °C per un periodo che varia da 15 a 60 minuti, dipendentemente dal tipo di impasto e pezzatura.

Le modificazioni dell'impasto lievitato durante la cottura sono:

- a **30 °C**: l'impasto si rigonfia con sviluppo di anidride carbonica;
- a **45-50 °C**: si intensifica l'azione fermentativa dei lieviti;
- a **50 °C**: distruzione dei lieviti;
- a **60 °C**: inizia la denaturazione delle proteine;
- a **70 °C**: inizia la coagulazione del *glutine*; l'*alcol etilico* e le altre sostanze aromatiche evaporano;
- a **100 °C**: evaporazione di tutta l'acqua superficiale;
- a **120 °C**: formazione di *destrine* dall'amido e colorazione della crosta;
- a **140-150 °C**: caramellizzazione degli zuccheri e formazione degli aromi caratteristici del pane fresco;
- a **150-200 °C**: si forma il colore bruno;
- **oltre i 200 °C**: si innescano processi decompositivi e l'impasto carbonizza.

Il pane, cotto al punto giusto, viene tolto dal forno e lasciato raffreddare per qualche ora a temperatura ambiente prima del consumo.

Il **pane** può essere venduto al minuto anche dopo essere stato sottoposto a **cottura parziale**. In questo caso deve essere confezionato in imballaggi preconfezionati con la denominazione "**parzialmente cotto**" e l'avvertenza che il prodotto va cotto al forno.



Caratteristiche nutrizionali

Il pane è un **alimento energetico** per l'elevato apporto di glucidi sotto forma di *amido* (50-60% circa).

Il suo valore nutritivo varia in funzione del tipo di farine che sono state utilizzate per prepararlo.

Interessante è anche l'apporto di proteine rappresentate principalmente dal *glutine* (7-8 % circa) che, pur essendo di basso valore biologico, possono essere ulteriormente arricchite associando il pane con alimenti a proteine complementari. Dal punto di vista proteico sono considerate buone associazioni: pane + latte, pane + formaggi, pane + insaccati. L'amminoacido limitante è la *lisina*, pertanto occorre sempre integrare il consumo di pane con altri alimenti proteici.

Pane di tipo 0 Indicazioni nutrizionali per 100 g					
Energia (kcal)	275	Sodio (mg)	293	Vit. B ₁ (mg)	0,06
Protidi (g)	8,1	Potassio (mg)	–	Vit. B ₂ (mg)	0,06
Lipidi (g)	0,5	Ferro (mg)	0,7	Vit. PP (mg)	0,80
Glucidi (g)	63,5	Calcio (mg)	17	Vit. A (mcg)	0
Acqua (g)	31,0	Fosforo (mg)	77	Vit. C (mg)	0
Fibra (g)	3,8				

La digeribilità del pane varia in funzione di numerosi fattori come il grado di abbruttamento, lo stato di freschezza e la masticazione.

Il **pane integrale** rispetto al pane bianco apporta un notevole contributo di *fibra alimentare* (ricca di cellulosa). La fibra è importante perché non dà potere energetico (non essendo digerita) e inoltre favorisce l'evacuazione intestinale con la conseguenza di un minor tempo di permanenza nell'intestino. Il pane integrale è inoltre più ricco in principi nutritivi e dà maggior senso di sazietà.

Per limitare l'azione antinutrizionale dei *fitati* (sostanze presenti soprattutto nella crusca del pane integrale che impediscono l'assorbimento di sali minerali, ad esempio Ca e Fe), è consigliabile il consumo di pane integrale a fermentazione acida (*Saccharomyces minor*). In questo caso l'*acido fitico* viene distrutto quasi del tutto dall'enzima *fitasi*.

La quantità di lipidi è scarsamente presente, tranne per i pani speciali prodotti appunto con l'aggiunta di grassi.

L'apporto in vitamine e sali minerali diminuisce con il grado di raffinazione subito dalle farine; tuttavia è bene ricordare la presenza di vitamine del complesso B (B₁, B₂, PP) e i sali calcio, fosforo e ferro. Il complesso vitaminico B viene comunque in gran parte distrutto con la cottura del pane, mentre la scarsità di calcio ed il basso rapporto Ca/P (0,1-0,2) rendono il pane un **alimento rachitogeno** dato l'insignificante contributo di questi minerali. Tale carenza viene annullata associando adeguatamente il consumo di pane con altri alimenti (es.: pane + formaggi).

Il pane prodotto con le farine convenzionali non può essere consumato da chi soffre di morbo celiaco a causa dell'intolleranza al glutine.

I LIEVITI NELLA PRODUZIONE DEL VINO

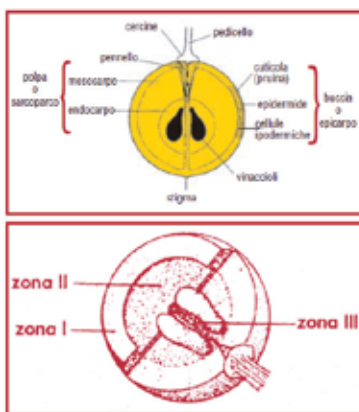
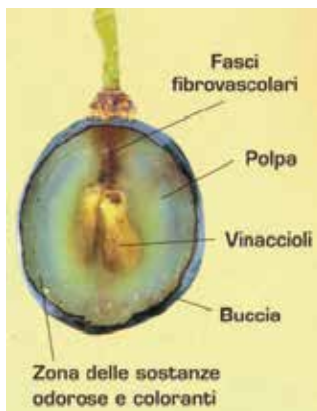
Il **vino** viene prodotto a partire da soluzioni zuccherine ottenute dallo schiacciamento del grappolo d'uva, lasciate fermentare con i lieviti unicellulari del genere *Saccharomyces* presenti sulla buccia dell'acino o provenienti da colture selezionate.

A seconda delle condizioni di fermentazione, si differenziano le qualità organolettiche (colore, sapori, aromi...) del vino caratteristiche che si arricchiscono ulteriormente durante le fasi successive di lavorazione.

Prima di tutto consideriamo la caratteristica dell'uva, che è il substrato sul quale agiscono i lieviti.

L'infruttescenza della vite è il **grappolo d'uva** costituito da:

- **graspo** o raspo, che rappresenta la struttura centrale ramificata;
- **acino** o bacca, che rappresenta il frutto vero e proprio, formato a sua volta da:
- **buccia**, la parte esterna ricca di *sostanze coloranti* (antociani per i vini rossi, flavoni per i vini bianchi), aromatiche e tannini, ricoperta da una cuticola cerosa protettiva detta *pruina* (che trattiene tra l'altro i lieviti della fermentazione);
- **polpa**, la parte interna ricca di *sostanze acidule* (acidi organici) e *zuccherine* (glucosio e fruttosio), che costituiranno la componente principale del mosto d'uva ottenuto dopo la pigiatura.
- **vinaccioli**, sono i semi ricchi di sostanze grasse e di tannini che non vanno schiacciati durante la vinificazione per non alterare la qualità del vino. Dai semi si ricava l'olio di vinaccioli.



L'acino d'uva è costituito da: buccia; polpa; vinaccioli. Può essere suddiviso in tre zone, ciascuna delle quali presenta una composizione chimica diversa ed ha un diverso effetto sul vino.

Uva rossa (vitigno Merlot). Gli acini sono ricoperti da una sostanza cerosa, la pruina, che trattiene i microrganismi presenti nell'atmosfera, tra cui i lieviti.

La raccolta dell'uva e le tecniche adottate per la produzione del vino variano in funzione del tipo di uva utilizzata, del suo grado di maturazione e della qualità di prodotto che si vuole ottenere.

Normalmente le fasi produttive del vino sono caratterizzate da: **vendemmia; preparazione del mosto; fermentazione alcolica; tipi di vinificazione; cure e correzioni del vino; stabilizzazione; invecchiamento e imbottigliamento** del vino.

ACINO	
BUCCIA (10-15% dell'acino)	
Acqua	70-80%
Tannino, Sostanze coloranti, aromatiche, azotate,	1-3%
POLPA (80-85% dell'acino)	
Acqua	80-90%
Zuccheri	15-25%
Acidi e sali relativi	4-15%
Sostanze minerali	2-6%
Sostanze azotate	0,1-1,5%
VINACCIOLI (1,5-5% dell'acino)	
Tannino	2-10%
Sostanze grasse	8-12%

MATURAZIONE DELL'UVA

Un parametro importante per la valutazione della maturazione dell'uva è l'**indice di maturazione (IM)**, ovvero il rapporto tra gli zuccheri e gli acidi, il quale deve essere compreso tra 2 e 5.

$$IM = \frac{\text{zuccheri (\%)}}{\text{acidi (\%)}} = 2 \div 5$$

I valori più alti dell'IM si riscontrano nelle zone calde, mentre quelli più bassi corrispondono alle zone fredde.



Uva bianca di tipo Chardonnay

Vendemmia

Il **periodo di raccolta dell'uva** varia da zona a zona ed è influenzato dall'andamento stagionale delle piogge e della temperatura. Normalmente si effettua quando l'uva ha raggiunto il giusto grado di maturità (nei mesi di settembre-ottobre), ma può essere anticipato o posticipato in funzione del clima e delle caratteristiche del futuro vino.

Con la **maturazione dell'uva** aumentano gradualmente gli zuccheri semplici (glucosio e fruttosio) presenti nella polpa dell'acino. In questa fase si verifica anche l'aumento delle sostanze coloranti delle bucce, mentre diminuiscono gli acidi organici liberi e le sostanze tanniche.

La scelta del momento opportuno per la vendemmia è dato dall'**indice di maturazione** che dipende dal rapporto tra la quantità di zuccheri e quella di acidi organici.

Per giudicare il grado di maturazione dell'uva vengono impiegati strumenti come il *mostimetro* ed il *rifrattometro* che permettono la valutazione percentuale degli zuccheri presenti nella polpa dell'acino.



Preparazione del mosto

Le uve scelte vengono trasportate il più presto possibile in cantina dove avviene l'ammontamento mediante le seguenti fasi:

Pigiatura

Questa operazione, che un tempo si eseguiva con i piedi, consiste nello schiacciamento degli acini in macchine a rulli lisci controrotanti, dette pigiatrici, ai fini di ottenere la fuoriuscita del succo che sarà il "mosto".

Diraspatura

Consiste nell'allontanamento dei raspi dal mosto principale e si effettua con macchine diraspatrici.

Le operazioni di pigiatura e di diraspatura possono venire effettuate contemporaneamente con macchine *pigia-diraspatrici*, oppure con *diraspa-pigiatrici*, qualora sia necessario evitare anche il minimo schiacciamento dei raspi.

Sgrondatura

È un'operazione utile per la produzione dei vini bianchi e consiste nell'allontanare, mediante macchine *sgrondatrici*, la parte liquida del mosto dalle parti solide dette vinacce (residui di bucce e vinaccioli).

Torchiatura

Questa operazione, che si effettua con il torchio, permette di recuperare il mosto residuo contenuto nelle vinacce.



Il **mostimetro** serve per controllare i **gradi babilonici** del mosto d'uva. Con alcuni calcoli si può risalire al futuro grado alcolico del vino.

Il mosto d'uva prodotto durante le operazioni di ammostamento può venire analizzato ed eventualmente corretto per garantire la qualità del vino che verrà prodotto.

L'aumento del contenuto zuccherino consente di aumentare il grado alcolico del vino. In molti Paesi dell'Unione Europea tale operazione è effettuata con l'aggiunta di saccarosio, mentre nel nostro Paese è consentita solo l'aggiunta di mosto concentrato, di mosto concentrato rettificato, di mosto muto e di filtrato dolce.

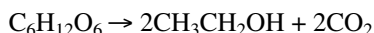
L'acidità può essere innalzata mediante aggiunta di acido tartarico, mentre per eliminare colorazioni non gradite è consentito l'impiego di carbone enologico prima della fermentazione.

Il lievito in condizioni anaerobiche trasforma 100 grammi di zucchero in 51,1 di alcol etilico con un rendimento in volume del 65,5%. Questo è un rendimento ideale, nella realtà una parte dello zucchero disponibile è utilizzata dal lievito per moltiplicarsi. Inoltre, durante la fermentazione i lieviti del mosto producono, oltre l'alcol e l'anidride carbonica, anche prodotti secondari (glicerina, acido acetico, acido succinico) che contribuiscono a caratterizzare l'aroma del prodotto finito. Il rendimento reale quindi si approssima al 60% in volume.

Composizione media del mosto d'uva	
Acqua	70-80%
Zuccheri (glucosio e fruttosio)	15-30%
Acidi organici (tartarico, malico, citrico)	0,5-1,5%
Altri componenti:	quantità minime
- pigmenti coloranti	
- acidi inorganici	
- tannini	
- sostanze azotate	
- sostanze aromatiche	
- vitamine	
- enzimi	
- sali minerali	
N.B.: la quantità di zucchero presente nel mosto d'uva determinerà la gradazione alcolica del vino prodotto: Gradazione alcolica = conc. zuccheri x 0,6	

Fermentazione alcolica

La trasformazione del mosto in vino è dovuta alla fermentazione alcolica determinata dai lieviti che si nutrono a spese dello zucchero presente nel mosto, producendo principalmente alcol etilico e anidride carbonica, secondo la seguente reazione:



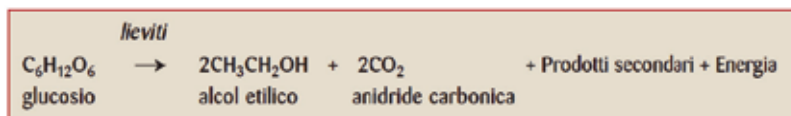
I produttori di vino usano differenti ceppi di lieviti a seconda del tipo di vino e delle condizioni dell'uva. Troppo zucchero o un'eccessiva concentrazione di alcol rallenta la crescita del lievito, perciò per uve con molto zucchero sono necessari lieviti che ben sopportano elevate concentrazioni zuccherine. Se il lievito muore prima che tutti gli zuccheri fermentabili siano stati trasformati in alcol, il risultato è una fermentazione "bloccata".

I **lieviti** sono microscopici funghi unicellulari, presenti naturalmente sulla buccia dell'uva e trattenuti dalla *pruina*. I lieviti che rivestono particolare impor-

tanza in enologia appartengono a due categorie:

- **lieviti apiculati**, a forma di limone, iniziano la fermentazione (es. *Kloeckera apiculata*), ma producono poco alcol e molti prodotti secondari non graditi, tra cui l'acido acetico; la loro azione si esaurisce in breve tempo;
- **lieviti ellittici**, a forma ellittica, sono di dimensioni maggiori e importanti per la fermentazione.

tazione in quanto diffusi e resistenti all'alcol che si viene formando. Questi lieviti appartengono al genere *Saccharomyces* (*S. ellipsoideus*, *S. cerevisiae*, ecc.). Man mano che la presenza e l'attività degli *apiculati* vanno calando, cominciano a entrare in atto i *lieviti ellittici*, che non trovano competizione da parte di altri microorganismi.



In base alle necessità di vinificazione possono essere aggiunti al mosto anche ceppi di lieviti selezionati.

Alcuni lieviti sono selezionati in base agli aromi che tendono a sviluppare. **Lieviti naturali** sono già presenti sulla superficie degli acini d'uva (la *pruina*), perciò il succo d'uva tenderà spontaneamente a fermentare a meno che i lieviti non vengano fermati con temperature basse o con solfiti.

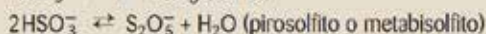
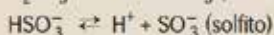
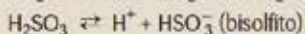
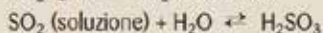
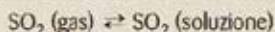
Negli anni novanta si è discusso molto sulla pratica di fermentare il vino con **lieviti selezionati** anziché i cosiddetti lieviti autoctoni. I fautori dell'uso dei lieviti selezionati sostenevano che si potevano ottenere vini molto più fini, eleganti e privi di difetti. I sostenitori dei lieviti autoctoni sostenevano che l'uso di lieviti selezionati deformava anche pesantemente i sentori tipici di una zona e che si sarebbero potuti creare sentori secondari a tavolino.

Parlare di una "**tipicità del lievito**" è però un concetto alquanto arduo. A proposito sono stati condotti numerosi studi relativi all'identificazione delle specie di lievito che popolano la superficie dell'uva, sia in Italia (De Rossi 1935, Castelli 1955 e 1967) che su vigneti francesi (Domercq 1953 e 1956). Tali studi non solo analizzano le caratteristiche delle specie sull'uva e



AZIONE DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA

La solfitazione si effettua durante la vinificazione per operare un'azione selettiva sui lieviti saccaromiceti e per la sua benefica azione antiossidante. L' SO_2 si presenta in varie forme libera o combinata:



È importante che il dosaggio sia corretto perchè un eccesso di anidride solforosa può causare:

- formazione di H_2S (idrogeno solforato) con "odore di uova marce";
- inibizione della fermentazione malo-lattica;
- vino alterato organoletticamente (retrogusto sgradevole) con disturbi gastrici ed emicranie (è il classico cerchio alla testa).

in fermentazione, dove si sviluppano maggiormente quali sono i vettori, ma soprattutto hanno quantificato l'incidenza di tali ceppi sulla qualità o sui difetti del prodotto. Si è verificato come dei pochi ceppi "autoctoni" isolati molti presentano caratteristiche deleterie dal punto di vista enologico (alte produzioni di acido acetico, scarsa resistenza a basse temperature e a pH bassi, basse rese fermentative). La stragrande maggioranza degli isolamenti conferma infatti come i lieviti, presenti sull'uva prima e nel mosto poi, vengano in realtà da contaminazioni con macchinari di cantina e ambientali, senza alcuna connessione con il concetto di Tipicità o di *Terroir*.

L'incidenza del lievito sulla qualità del vino (a differenza di quanto avviene con la birra) è relativa solo all'assenza di difetti; la qualità o la tipicità risiedono maggiormente nelle potenzialità dell'uva e nelle tecniche colturali ed enologiche.

Nella vinificazione sono in genere utilizzati *Saccharomyces cerevisiae* per le fermentazioni dei mosti normali e *Saccharomyces bayanus* per le fermentazioni di mosti ad alto contenuto zuccherino o per la presa di spuma.

Le fermentazione procede attraverso due stadi: dapprima si ha la "**fermentazione tumultuosa**" che dura circa 7-10 giorni e che avviene con notevole svolgimento di anidride carbonica e sviluppo di calore, tali da provocare l'ebollizione del liquido; segue la "**fermentazione lenta**", che può durare da 1 a 3 mesi. Se il vino non è stato pastorizzato un certo processo di trasformazioni fermentative lente continua ancora nel vino in bottiglia.

Spesso si aggiunge al mosto **anidride solforosa** (SO₂) allo scopo di regolare la fermentazione alcolica in quanto ha il potere di inibire la vita dei microrganismi indesiderati e di lasciare in vita i *lieviti ellittici* che presentano invece buona capacità fermentativa. L'anidride solforosa può essere utilizzata in forma gassosa o più comunemente in forma salina come *bisolfito* o *metabisolfito di potassio* in polvere.

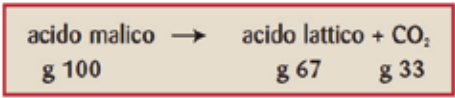


Fermentazione alcolica degli amminoacidi

Alcuni lieviti si nutrono di *amminoacidi* presenti nel mosto per produrre *alcoli superiori* (alcoli con numero di atomi di C superiore a 3) che danno al vino caratteristiche particolari di profumo.

Fermentazione malo-lattica

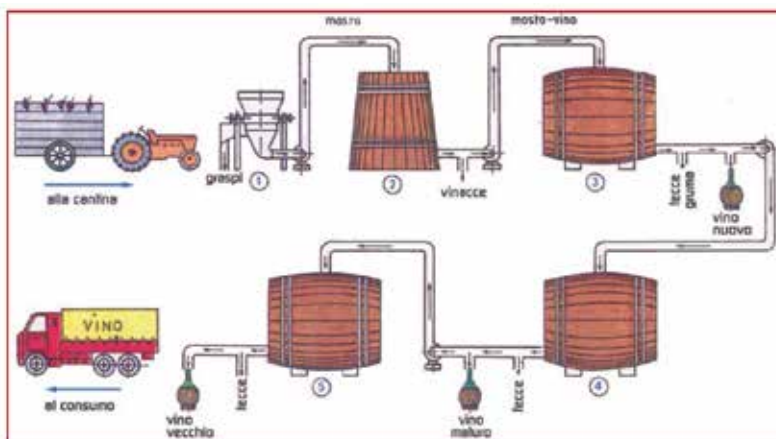
È dovuta ad alcuni lieviti che trasformano l'*acido malico* in *acido lattico* e contribuiscono quindi ad abbassare l'acidità del vino che diventa meno aspro e più morbido.



Questo tipo di fermentazione (che si verifica normalmente nella primavera successiva alla vendemmia) è importante nei vini rossi, mentre non è desiderabile nei vini bianchi e rosati; pertanto con questi ultimi vini viene inibita da buone dosi di anidride solforosa.

Schema di vinificazione

- 1) macchine pigiatrici-diraspatrici
- 2) tini di fermentazione (fermentazione primaria o tumultuosa)
- 3) botti di deposito (fermentazione secondaria)
- 4) botti di maturazione
- 5) botti di invecchiamento



Tipi di vinificazione

In base alle caratteristiche del vino che si vuole produrre vengono adottate diverse tecniche di vinificazione che si distinguono in:

Vinificazione in rosso

Si attua per i vini rossi e consiste nel far avvenire la fermentazione del mosto in presenza di vinacce, pertanto è detta più propriamente vinificazione con macerazione.

In questo modo il liquido fermentante si arricchisce delle sostanze coloranti e dei tannini che passano in soluzione. Per i vini rossi il tempo di contatto del mosto con le vinacce dura tutto il periodo della fermentazione tumultuosa, mentre per i vini rosati varia da qualche ora a 12-24 al massimo.

Vinificazione in bianco

Consiste nel far avvenire il processo fermentativo del mosto in assenza di vinacce. Queste ultime vengono eliminate subito dopo la pigiatura e diraspatura mediante il processo della sgrondatura. Poiché i pigmenti coloranti sono presenti nelle bucce degli acini, con questo metodo si ottengono vini bianchi o poco colorati con qualsiasi tipo di uva.

Vinificazione in rosato

Per ottenere un vino rosato si può operare:

- vinificando con una breve macerazione uve rosse di poco colore o un uvaggio (miscuglio) di uve bianche e rosse;
- vinificando in bianco uve rosse di qualsiasi varietà.

Vinificazione in continuo

Si effettua nelle aziende enologiche di tipo industriale mediante l'impiego di speciali recipienti ad alta capacità (1000-4000 litri).

Il mosto viene immesso continuamente dal basso nel vinificatore contenente i lieviti, mentre il vino nuovo che si forma viene prelevato dalla parte superiore e terminerà la sua fermentazione.

tazione in altri recipienti. Con questa tecnica si risparmia manodopera e si ottiene un vino con caratteristiche organolettiche costanti.

Termovinificazione

Questa tecnica viene impiegata soprattutto per uve rosse danneggiate da muffe o per uve poco mature. Si effettua riscaldando l'uva o il mosto ottenuto dalla pigiatura a 50-60 °C per qualche ora, oppure a 80-90 °C per 10-15 minuti. In questo modo si distruggono i microrganismi nocivi e anche i lieviti, che vanno successivamente introdotti sotto forma di ceppi selezionati.

Il vino che si ottiene con la termovinificazione risulta più colorato e con caratteristiche più uniformi dovute ad una fermentazione regolare.



Vinificazione con macerazione carbonica



Questo tipo di vinificazione si effettua mettendo i grappoli d'uva interi in recipienti chiusi, il cui volume viene saturato di anidride carbonica (CO₂). La temperatura viene portata a circa 30 °C, in modo da innescare un'**autofermentazione** all'interno delle cellule dell'uva, che porta alla produzione di numerosi composti. La **macerazione**, in queste condizioni, procede per 5-20 giorni, dopodiché il mosto viene avviato alla normale **fermentazione alcolica** che avverrà rapidamente nel giro di due o tre giorni. È da sottolineare che il metodo di vinificazione della macerazione carbonica, oltre alle caratteristiche olfattive particolari, dona al vino un colore particolarmente vivo, con tonalità che ricordano il porpora e un gusto dove predomina la freschezza degli aromi.

La vinificazione con macerazione carbonica si effettua per l'ottenimento del **vino "Novello"**. Questo vino può essere messo in vendita ufficialmente dal 6 Novembre ed imbottigliato fino al 31 Dicembre dell'anno di vendemmia. La legislazione, inoltre, affinché il vino possa essere chiamato Novello, prevede l'utilizzo obbligatorio a macerazione carbonica per almeno il 30% dell'uva, mentre il restante 70% può essere vinificato con il metodo tradizionale.

Cure e correzioni del vino

Alla fine della fermentazione sono necessarie alcune operazioni che garantiscono l'integrità e la qualità del vino neofornato. Le **cure** più importanti sono:

Colmature

Si effettuano periodicamente mediante *aggiunta di vino della stessa qualità* nelle botti o nei vasi vinari. In questo modo si colmano i cali dovuti ad evaporazione, allo scopo di evitare il contatto del vino con l'aria e di conseguenza le temute ossidazioni. Per questa operazione si utilizzano i tappi di colmatura, oppure, in alternativa è possibile l'uso di gas inerti come l'azoto o l'anidride carbonica.



Travasi

Si effettuano allo scopo di eliminare le *fecce* che si depositano sul fondo dei recipienti. Normalmente sono necessari per i vini rossi 3-4 travasi il primo anno (a dicembre, marzo, giugno ed eventualmente settembre) e se il vino è destinato all'invecchiamento, altri due travasi per ogni anno successivo. Per i vini bianchi il numero di travasi è inferiore perché si formano meno fecce.

Le **correzioni** sono necessarie per migliorare i requisiti qualitativi richiesti dai criteri di commercializzazione del vino stesso. Si possono distinguere in:

- **Taglio**, che consiste nel mescolare vini diversi allo scopo di modificare o equilibrare il grado alcolico, l'acidità, il colore, ecc.
- **Rifermentazione**, si effettua allo scopo di trasformare in alcol tutto il residuo zuccherino, oppure per ringiovanire i vini troppo vecchi. La nuova fermentazione viene attivata aggiungendo al vino mosto fresco e un innesto di lieviti selezionati. Di solito viene fatta quando nel vino è rimasto troppo zucchero non fermentato. Si ottengono vini più freschi, vivaci e profumati.
- **Correzioni vere e proprie**, necessarie per modificare qualche caratteristica del vino per garantire parametri qualitativi di grado alcolico, acidità, colore, contenuto tannico, ecc.



Correzioni del vino	
Correzione del grado alcolometrico	L'aumento del grado alcolico può essere fatto con dei tagli o con la crioconcentrazione , dove il vino viene portato ad una temperatura di -10/-14°C, così si permette la formazione di cristalli di ghiaccio, che poi verrà eliminato. L'aggiunta di alcol puro è consentita solo per i vini liquorosi.
Correzione dell'acidità	Per aumentare l'acidità si può aggiungere acido tartarico o citrico. Per diminuirla carbonato di calcio, bicarbonato di potassio. Si possono fare anche opportuni tagli.
Correzione del colore	Viene fatto con dei tagli di vini molto colorati. Per decolorarlo si usano dei carboni vegetali.
Correzioni del contenuto tannico	Per alzare il contenuto tannico si può aggiungere del tannino enologico. Per diminuire bisogna trattare il vino con gelatina o albumina.

Stabilizzazione

Prima dell'imbottigliamento, il vino deve essere reso limpido e stabilizzato fino al momento del consumo. La **stabilizzazione** si può effettuare con metodi vari come filtrazione, centrifugazione, chiarificazione e se necessario per scopi conservativi anche con la refrigerazione o pastorizzazione.

L'impiego dei **chiarificanti** costituisce



il sistema più tradizionale per *illimpidire* il vino. I chiarificanti **possono essere di origine organica (i più usati) o inorganica**. Tra i primi citiamo la gelatina, la caseina, le sieroalbumine, la chiara d'uovo, la colla di pesce, la colla d'ossa. Tra i secondi, la bentonite, un'argilla molto pura. Queste sostanze, immesse nel vino, precipitano più o meno lentamente e, con meccanismi che possono variare secondo i tipi di chiarificanti, trascinano con sé le particelle in sospensione nel liquido formando un deposito che viene poi eliminato.

Trattamenti di stabilizzazione del vino	
<i>Filtrazione</i>	Viene impiegata allo scopo di eliminare le sostanze sospese nel vino stesso. Si effettua per setacciamento mediante l'impiego di setti filtranti porosi; per adsorbimento sfruttando l'attrazione elettrostatica delle piccole particelle sospese in modo da poter garantire il trattenimento di sostanze più piccole dei pori; mediante l'impiego di filtri a membrana microporosa che trattengono anche i microrganismi. In pratica si effettua una microfiltrazione del vino.
<i>Centrifugazione</i>	L'impiego della centrifuga consente di ottenere vini e mosti limpidi, privati delle particelle solide più pesanti.
<i>Chiarificazione</i>	Viene effettuata aggiungendo al vino sostanze colloidali che provocano la flocculazione e la precipitazione delle particelle in sospensione. Tra i chiarificanti di origine minerale si utilizza la bentonite (argilla) e la silice, mentre tra quelli di origine organica trovano impiego la gelatina, l'albumina, la caseina e la colla di pesce.
<i>Refrigerazione</i>	Il vino viene portato alle basse temperature (-4/ -10 °C) per alcuni giorni. In questo modo si favorisce la precipitazione di diverse sostanze come tartrati, coloranti, proteine, solfuro di rame, ecc., che vanno eliminate successivamente per filtrazione.
<i>Pastorizzazione</i>	Si effettua principalmente allo scopo di distruggere l'attività dei microrganismi nel vino e quindi garantire la conservazione del prodotto.

Invecchiamento

L'invecchiamento interessa soprattutto i **vini rossi** che presentano una gradazione alcolica di almeno 12°, un buon contenuto di tannini e di acidi organici. Esso viene effettuato con una prolungata permanenza nelle botti di legno, oppure in bottiglie e per alcune qualità di vino può durare anche parecchi anni (es. 5 anni per il Barolo riserva).

I **vini novelli** non subiscono alcun invecchiamento, mentre i **vini bianchi** sono generalmente maturi e pronti per il consumo nella primavera successiva alla vendemmia. Per questi ultimi l'invecchiamento è responsabile di alterazioni organolettiche e di ossidazioni (vino maderizzato).

L'**invecchiamento dei vini rossi** avviene generalmente in due momenti:

- prima fase, preferibilmente in botti di legno pregiato;
- seconda fase, in bottiglia.

Nell'invecchiamento dei vini rossi in botti di rovere si formano sostanze diverse: **acetali**, odorosi composti provenienti dalla reazione di alcune aldeidi (specialmente dell'acetaldeide) con alcoli (specialmente con l'alcol etilico); la formazione di **eteri fissi**, che influiscono sul sapore, e di **eteri volatili**, che influiscono fortemente sul profumo; infine, la formazione di **esteri**, alcuni dei quali altamente profumati, dovuta alla reazione di acidi con alcoli. L'insieme di queste sostanze concorre alla formazione del **bouquet** del vino (insieme di sensazioni olfattive profumate) e del suo **goudron** (gradevole aroma leggermente catramoso, tipico dei vini rossi vecchi),



Imbottigliamento

Dopo la maturazione e l'eventuale invecchiamento il vino viene imbottigliato secondo regole precise che riguardano il periodo, la pulizia delle bottiglie di vetro e l'impiego dei tappi.

Un buon imbottigliamento favorisce nella bottiglia l'ambiente determinante per la formazione di quei composti che caratterizzano definitivamente il vino.

I LIEVITI NELLA PRODUZIONE DELLA BIRRA

La birra si ottiene per l'azione di lieviti delle specie *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces pastorianus* su di un mosto contenente malto di orzo, ed eventualmente anche quantità variabili di malti di altri cereali (grano, riso o mais). La lavorazione è tale da conservare nel prodotto anche l'anidride carbonica.

Sottoprodotti dei birrifici sono il "lievito di birra" venduto disidratato o compresso in panetti e l'anidride carbonica.



La **birra** si ottiene dalla **fermentazione alcolica** dei **mosti** preparati con *malto d'orzo*, *acqua*, *aromatizzati con luppolo* e *saturati di anidride carbonica*.

La birra è la bevanda alcolica più consumata al mondo ed è una delle bevande più antiche prodotte dall'uomo, probabilmente databile al settimo millennio a.C., registrata nella storia scritta dell'antico Egitto e della Mesopotamia (terzo millennio a.C.).

Le materie prime che si utilizzano per preparare la birra sono: orzo (ed eventualmente altri cereali) per ottenere il malto, acqua, luppolo e lievito.

Produzione

La produzione della birra si effettua secondo le seguenti fasi:

Preparazione del malto (maltaggio)

I **chicchi d'orzo** (*orzo distico*) dopo essere lavati e calibrati, vengono posti a macerare in

grosse vasche piene d'acqua per circa due o tre giorni finché raggiungono una umidità compresa tra il 40-45%.

L'orzo viene quindi fatto **germinare** in grandi cassoni o cilindri rotativi a pareti forate per circa 5-10 giorni. La radichetta che si sviluppa favorisce la formazione di alcuni enzimi *proteoglicolitici* ed in particolare della *maltasi*. L'orzo germogliato viene essiccato e torrefatto a seconda che si vogliono ottenere malti per birre chiare o malti per birre scure. Per avere **malti chiari** si opera alle temperature di 40 - 60 °C, mentre per i **malti scuri** si favorisce la caramellizzazione degli zuccheri, essiccando e tostando a temperature un po' più elevate (60-100°C).

Il **malto** così torrefatto viene conservato in appositi silos e presenta una composizione costituita dal 50-60% di amido con un'umidità dell'1,5-3%.

Preparazione del mosto (ammestamento)

Si tratta di una fase che consente di preparare un **decocto di malto** e nella sua saccharificazione.

Il malto viene macinato in modo da ottenere uno sfarinato che va mescolato con acqua tiepida. L'acqua deve essere potabile e non "dura" (cioè ricca di sali minerali) perché i sali dell'acqua influenzano l'acidità del mosto e quindi lo sviluppo delle reazioni enzimatiche. L'impasto che si forma favorisce l'attività dell'enzima *amilasi* che trasforma l'amido in maltosio fermentescibile e destrine. La preparazione del mosto detta anche **saccharificazione** si può effettuare per:

- **infusione** (metodo inglese), mescolando lo sfarinato con acqua a 40 °C e riscaldando lentamente fino a 60-70°C;

- **decozione** (o tempera), mescolando lo sfarinato con acqua fredda che si riscalda lentamente a 50 °C. Una parte dell'impasto subisce un trattamento a 70-100 °C e viene successivamente rimescolato con il tutto, in modo da ottenere una temperatura finale di circa 60-70 °C.

Il **mosto** viene quindi sottoposto a filtrazione per allontanare i residui insolubili definiti *trebbie* (utilizzabili per i mangimi).

Aromatizzazione (luppolamento)

Il mosto una volta trasferito nelle caldaie viene aromatizzato con il **luppolo** (*Humulus lupulus*). Alla soluzione zuccherina (mosto) si aggiungono le infiorescenze femminili di luppolo in quantità variabile in base al tipo di birra che si vuole ottenere. Il classico sapore amaro è dovuto ad un principio attivo detto *luppolina*. Si procede con la cottura per circa due ore in caldaie di rame in modo da favorire la concentrazione ed una parziale sterilizzazione. Dopo questa operazione si raffredda il mosto a circa 10 °C e si separano per filtrazione il luppolo e le sostanze coagulate.



Infiorescenze di luppolo

Fermentazione e maturazione

Per ottenere la **fermentazione** occorre aggiungere al mosto i **lieviti** *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces carlsbergensis* che trasformano il glucosio (derivato dal maltosio del



mosto) in alcol etilico e anidride carbonica. Nel corso della fermentazione si sviluppano molte sostanze secondarie che conferiscono sapore e aroma alla birra.

Si possono utilizzare due processi di fermentazione:

- **fermentazione bassa**, viene effettuata alla temperatura di circa 5 °C con lieviti della specie *Saccharomyces carlsbergensis*. È caratterizzata da una fermentazione tumultuosa in tini aperti per circa 8-12 giorni; durante questo periodo il lievito tende a depositarsi sul fondo. Si procede successivamente con una fermentazione lenta, in botti chiuse, per 2-3 mesi, in modo da maturare la birra e favorire la saturazione di anidride carbonica. La fermentazione bassa si utilizza soprattutto per produrre birre di colore chiaro.

- **fermentazione alta**, viene effettuata alla temperatura di circa 15 °C con lieviti della specie *Saccharomyces cerevisiae*. È caratterizzata da una prima fermentazione tumultuosa in tini aperti per circa 3-5 giorni; durante questo periodo il lievito tende a rimanere sulla superficie del mosto. Successivamente si fa avvenire una fermentazione lenta in botti chiuse per un periodo variabile da 1 a 3 mesi in modo da maturare la birra e favorire la saturazione di anidride carbonica. La fermentazione alta si utilizza soprattutto presso produttori di birra che classificano i lieviti come “*Top-fermenting*” e “*Bottom-fermenting*”. Questa classificazione è stata introdotta dal danese Emil Christian Hansen.

I lieviti *Top-fermenting* (così chiamati perché galleggiano sulla superficie della birra) preferiscono temperature più alte e danno alla birra un profilo aromatico complesso, con toni fruttati e speziati. Il classico lievito ad alta fermentazione è *Saccharomyces cerevisiae*, conosciuto come *ale yeast*. Esempio classico di birre in cui vengono utilizzati sono le *ale*.

I lieviti *Bottom-fermenting* lavorano a basse temperature e alla fine della loro attività si depositano sul fondo. Fra questi: *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces carlsbergensis* usati per produrre birre tipo-*lager*.

Infine ci sono le *Lambic*, che sono birre caratterizzate dalla fermentazione spontanea. Le birre *lambic* sono prodotte esclusivamente nella regione del Payottenland, a sud-ovest di Bruxelles, in Belgio. Birre prodotte con modalità analoghe al di fuori di questi territori sono denominate “*Lambic-style*” oppure “*Plambic*” (ovvero *Pseudo-lambic*), sebbene questa sia una distinzione puramente volontaria effettuata per rispetto all’originale.

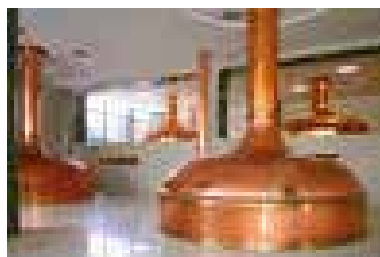
Al contrario delle *ale* e *lager* convenzionali, che sono fatte fermentare utilizzando ceppi di lievito accuratamente selezionati per lo scopo, il *Lambic* è prodotto attraverso fermentazione spontanea: il mosto di birra viene esposto ai lieviti selvatici e ai batteri autoctoni della valle della Senna, in cui si trova Bruxelles.

Condizionamento e confezionamento

Alla **maturazione**, la birra viene filtrata e trasferita nei serbatoi di pressione per *sovrasaturare* la bevanda di anidride carbonica e favorire la formazione di una schiuma persistente.



Lieviti



Tino di fermentazione



La birra è quindi pronta per essere commercializzata in fusti, lattine o bottiglie. All'**imbotigliamento** (lattine o bottiglie), segue la pastorizzazione in modo da garantire la conservabilità del prodotto che viene immesso sul mercato. La birra va conservata ad una temperatura di 5-7 °C. In commercio si trovano anche birre di qualità *non pastorizzate* che richiedono un consumo immediato delle stesse.

Classificazione

In base al colore, le birre si possono distinguere in:

- **chiare** o bionde;
- **rosse**;
- **scure** o brune.

In base al tipo di fermentazione, invece, si distinguono in:

- **birre a bassa fermentazione** (es. *Pilsen*, *Münchner*), più fresche e dissetanti;
- **birre ad alta fermentazione** (es. *Ale*, *Stout*), corpose e saporite.

Un'ulteriore classificazione è legata al **grado alcolico**, generalmente misurato in percentuale di alcol sul volume della bevanda come "**titolo alcolometrico volumico**", o alla quantità di zuccheri fermentabili presenti nel mosto prima della fermentazione misurato in **gradi Plato**.

Ogni Paese ha denominazioni caratteristiche talvolta derivanti dalla tradizione.

La legislazione italiana prevede le seguenti categorie:

- **birra doppio malto**: oltre 14,5 gradi Plato e titolo alcolometrico volumico superiore a 4,8%;
- **birra speciale**: oltre 12,5 gradi Plato e titolo alcolometrico volumico superiore a 4%;
- **birra**: oltre 10,5 gradi Plato e titolo alcolometrico volumico superiore a 3,5%;
- **birra leggera o light**: grado Plato compreso tra 5,0 e 10,5 e titolo alcolometrico volumico compreso tra 1,2% e 3,5%;
- **birra analcolica**: grado Plato compreso tra 3,0 e 8,0 e titolo alcolometrico volumico inferiore a 1,2%.



Composizione chimica e valore nutritivo

La **composizione** della birra è abbastanza variabile in funzione delle diverse qualità commerciali. Mediamente è costituita dall'85-90% di acqua con un contenuto alcolico e saccarometrico che varia dipendentemente dalla definizione di birra normale, speciale, doppio malto, analcolica.

Il **grado alcolico** permette di stabilire anche il valore energetico della birra considerando che: **1 g di alcol etilico = 7 kcal**.

Il **grado saccarometrico** o **grado Plato** corrisponde ai grammi di estratto, zuccheri compresi, sciolti in 100 g del mosto impiegato per preparare la birra. La legge italiana prevede che la classificazione delle birre venga fatta in base ai gradi saccarometrici (cioè la concentrazione zuccherina) contenuti nel mosto e viene espressa in gradi Plato. Sull'etichetta viene, però, indicato il contenuto alcolico in volume.

Per fare l'equivalenza fra le due misure basta sapere che:

$$\begin{array}{c} \mathbf{1 \text{ Grado alcol}} \\ \mathbf{=} \\ \mathbf{3 \text{ gradi saccarometrici o gradi plato}} \end{array}$$

La **birra** apporta inoltre zuccheri, tracce di proteine, sali minerali e una discreta quantità di vitamine del gruppo B, grazie al contenuto di lieviti. La birra viene considerata una bevanda dissetante, grazie all'anidride carbonica; esercita una blanda azione digestiva grazie ai principi attivi contenuti nel luppolo e possiede proprietà diuretiche.



Una buona birra si deve presentare con sapore e odore caratteristici (dovuti al malto e al luppolo) ed una schiuma bianca persistente (indice di freschezza).

La **fermentazione lattica** è una forma di metabolismo energetico che avviene in alcuni batteri e nella cellula animale in assenza di ossigeno. Consiste nella trasformazione di una molecola di glucosio (o di un altro zucchero fermentabile) in due molecole di acido piruvico che vengono successivamente ridotte ad acido lattico con una bassa resa energetica. Questa via metabolica prende il nome dal principale prodotto finale, ma viene detta anche omolattica per distinguerla da quella eterolattica che utilizza un meccanismo diverso.

La fermentazione lattica svolta dai lattobacilli è presente nella vagina e nel tratto gastrointestinale umano in cui assume un ruolo tanto importante da spingere alcuni a considerare i lattobacilli dei probiotici.

La fermentazione lattica è coinvolta nella preparazione di numerosi alimenti, tra cui ricordiamo lo *yogurt*, il *kefir*, i capperi ed i crauti.

$$\text{CH}_3 \text{ CO COO}^- + (\text{NADH} + \text{H}^+) \rightarrow \text{CH}_3 \text{ HCOH COO}^- + \text{NAD}^+$$

(*Ac. piruvico* + *NADH* → *Ac. lattico* + *NAD*⁺)

Nei muscoli, in condizioni di carico intenso, viene prodotta energia a carico del glicogeno presente in loco, che viene prima scisso in glucosio e poi viene fermentato ad acido lattico. L'accumulo di questo catabolita genera l'affaticamento muscolare e viene gradualmente eliminato durante il recupero.

135

I **Crauti** costituiscono un tentativo in più per garantirsi scorte di cappucci per la stagione fredda, ottenendo così un prodotto trasformato a sé stante, base per preparazioni estremamente saporite. Sono il prodotto della fermentazione lattica dei cavoli cappucci. Questa fermentazione naturale viene controllata con l'aggiunta di sale da cucina. Il risultato è un alimento ricco di vitamine e sali minerali. Contrariamente a quanto si pensa, i crauti sono facilmente digeribili e hanno un potere digestivo perché rinforzano la flora batterica dell'apparato digerente, allontanando così batteri e virus patogeni.



I crauti sono un contorno ideale per würstel, cotechino, zampone, carni lesse e bollite.

Come si fanno (ricetta trentina)

I cavoli cappuccio vengono raccolti a fine settembre, primi di ottobre.

Dopo la raccolta si distendono in un luogo arioso per circa otto giorni ad asciugare, quindi si staccano le foglie esterne con un coltello, si leva il torsolo e si tagliano con un'apposita affettatrice. Vengono disposti a strati in contenitori alimentari (una volta erano barili di legno), sul fondo dei quali sono state precedentemente poste delle foglie di cavolo cappuccio.

I vari strati sono alternati ad una manciata di sale, al quale possono essere aggiunti semi di cumino, finocchio selvatico e bacche di ginepro. A riempimento raggiunto dei contenitori, i crauti devono essere ben pressati, quindi coperti con qualche foglia di cavolo al di sopra delle quali va posto un coperchio con un peso, per mantenere una pressione costante all'interno del contenitore. Così coperti e pressati, i crauti vengono lasciati fermentare, prima a temperatura ambiente, per una settimana, poi al fresco di una cantina per almeno 3-4 settimane.

Dopo cinque settimane i crauti sono pronti per il consumo.

A questo punto si leva il coperchio, le foglie di cavolo, il liquido in esubero, si lava il coperchio e si versa dell'acqua fresca in modo da coprire il tutto per 10 cm. Volendo prelevare dei crauti, si allontana l'acqua con una pignatta e si toglie la parte di prodotto che necessita uniformemente per tutta la superficie, si ricopre con il coperchio e si aggiunge nuovamente acqua fresca e si rimette il peso. Ogni otto giorni si deve rinnovare l'acqua e lavare il coperchio.

Conservazione: i crauti si conservano in locali freschi a 8 °C-12 °C.

Stagionatura: cinque settimane.

INGREDIENTI PER I CRAUTI: 1 kg di crauti, 5 dl di acqua (se asciugano aggiungetene ancora), sale, olio extravergine, ½ cipolla tagliata, ¼ di mela, ½ carota e ½ patata (se i crauti vi sembrano troppo acidi, che poi toglierete).

BIBLIOGRAFIA

Il materiale proposto in questo articolo è stato tratto per lo più dal volume di S. Rodato, *Conoscere gli alimenti*, Clitt-Zanichelli, 2012 e dai seguenti volumi:

- 1) Burini G., Fidanza F., Morini F., Panata G.B., Severini M., Testolin G., *Alimenti: caratteristiche nutrizionali, analisi, controllo*, Guido Gnocchi Editore, Roma, 1996.
- 2) Cappelli P., Vannucchi V., *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*, Zanichelli, Bologna, 2005.
- 3) Carnovale E., Marletta L. (a cura di), *Tabelle di composizione degli alimenti*, Istituto Nazionale della Nutrizione, Roma, 2007.
- 4) Costantini A.M., Cannella C., Tomassi G., *Fondamenti di Nutrizione Umana*, Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1999.

- 5) Donegani G., Menaggia G., *Nutrizione e salute oggi*, Franco Lucisano Editore, Milano, 2009.
- 6) Gasparini D., Rodato S. (a cura di), *Catalogo della mostra ALIMENTA*, Museo di Montebelluna, 2011.
- 7) Giorilli P., Lauri S., *Il pane. Un'arte, una tecnologia*, Zanichelli, Bologna, 1996.

LOTTA BIOLOGICA IN AGRICOLTURA E MICRORGANISMI

La **lotta biologica in agricoltura** impiega entità biologiche o molecole derivate da organismi viventi per controllare la crescita di organismi patogeni o parassiti e contenerne l'attività nociva.

Si tratta di una tecnica che sfrutta i rapporti di **antagonismo fra gli organismi viventi** per controllare e limitare le popolazioni di quelli dannosi. Il suo utilizzo pratico si è sviluppato in relazione alla coltura di agro-alimenti e per la difesa delle derrate alimentari nei *silos* di stoccaggio.



All'interno di ogni comunità, ogni specie è soggetta all'interazione con vari fattori di controllo, viventi o non, che regolano la "dinamica della popolazione". Il controllo biologico che si instaura nei confronti di altre specie di organismi viventi costituisce un insieme di rapporti di antagonismo quali:

- **competizione interspecifica**, ovvero la riduzione della fecondità, della sopravvivenza oppure dell'accrescimento d'una popolazione a causa della presenza d'altre specie interferenti;
- **predazione**, un tipo di interazione antagonista in cui un organismo predatore usa come fonte di cibo un altro organismo preda;
- **parassitismo**, una forma di interazione biologica, generalmente di natura trofica (alimentare), fra due specie di organismi di cui uno è detto parassita e l'altro ospite.

Per le sue prerogative la **lotta biologica** non abbate totalmente la popolazione di un organismo dannoso, bensì la mantiene entro livelli tali da non costituire un danno. Questo aspetto differenzia nettamente la *lotta biologica* da altri mezzi di difesa, come ad esempio la *lotta chimica convenzionale* e la *lotta biotecnica*, nei quali si può anche contemplare l'azzeramento della popolazione dell'organismo dannoso.

Nella **storia della lotta biologica**, l'organismo vivente più famoso è un tipo di **coccinella** denominato *Rodolia cardinalis*.

Pur essendo poco nota ai profani rispetto alla coccinella comune, venne introdotta dall'Australia negli Stati Uniti d'America, nella seconda metà del XIX secolo, allo scopo di combattere la **cocciniglia cotonosa solcata** (*Icerya purchasi*) da **Charles Valentine Riley**, considerato il padre della moderna lotta biologica e da **Albert Koebele**, esecutore materiale che diede il via alla più imponente operazione di lotta biologica della storia. Questo episodio ha dato impulso ad una moderna concezione di questo



Charles Valentine Riley
(1843-1895)



Albert Koebele
(1853-1924)

metodo di lotta. Nell'arco di alcuni decenni fu progressivamente introdotta in tutte le regioni agrumicole del mondo riducendo drasticamente la malattia degli agrumeti infestati da cocciniglia cotonosa.

La storia della *Rodolia cardinalis* è strettamente legata a quella della lotta biologica. L'uomo ha beneficiato dell'attività degli organismi ausiliari, più o meno consapevolmente, fin dall'antichità. I sistemi agricoli basati su un regime marginale e di sostentamento hanno tuttavia fatto in modo che il ruolo degli ausiliari si svolgesse in condizioni abbastanza simili ai contesti naturali. È soprattutto nella seconda metà dell'800 che si verifica un'intensificazione dell'emergenza fitosanitaria, soprattutto in relazione ad un incremento degli scambi commerciali fra continenti e all'evoluzione di un'agricoltura intensiva orientata verso il mercato. Basti pensare a quello che hanno significato l'importazione della *Peronospora* della patata nel 1845-1846, con la carestia irlandese, e della *Fillossera* della vite nel 1863, con la distruzione della maggior parte dei vigneti europei fino al 1890.

Se nei primi cinquant'anni del XX secolo ci sono stati casi clamorosi di successo con la lotta biologica, gli entusiasmi per questo tipo di lotta si spensero presto a causa di:

- limiti intrinseci del controllo biologico;
- errate conoscenze dei fitofagi o degli ausiliari;
- limiti nella conoscenza della morfologia, della biologia e dell'etologia;
- difficoltà di prevedere un'evoluzione del metodo di trattamento.

Nella seconda metà del 1900 le applicazioni di lotta biologica hanno visto risultati altalenanti e per lo più erano circoscritte in ambiti sperimentali più che operativi. L'applicazione ha indubbiamente risentito della concorrenza da parte della **lotta chimica**, che nel frattempo si è evoluta fino alla diffusione su larga scala dell'impiego dei *clororganici* e dei *fosfororganici*. D'altra parte, salvo casi limitati ed eclatanti come quello della *Rodolia cardinalis*, la lotta chimica ha in genere mostrato la sua efficacia nel breve termine, sia nei risultati sia nella semplicità di applicazione, mentre la lotta biologica rivela i suoi benefici nel lungo termine.

Negli ultimi decenni la **lotta biologica** ha avuto un notevole interesse per varie ragioni. In primo luogo ci si interessa di più alla lotta biologica per combattere le problematiche legate all'uso massiccio dei **pesticidi** che contaminano la *catena alimentare fino all'uomo* (consumatore finale). Rispetto alle strategie sviluppate o studiate dalla seconda metà del XIX secolo fino agli anni cinquanta, la lotta biologica s'inquadra, attualmente, come mezzo integrato nell'ambito di piani di difesa più compositi, soprattutto se coadiuvato da metodi di lotta *biotecnica*.

Le tecniche molecolari e le conoscenze entomologiche sviluppate negli ultimi vent'anni hanno dato un forte impulso all'allargamento del concetto e della pratica di questo tipo di lotta alle fitopatie. Le attuali ricerche sui meccanismi d'interazione tra gli organismi patogeni/parassiti e i loro ospiti hanno permesso lo sviluppo di nuove biotecnologie per il controllo dei patogeni basate non solo sull'uso di agenti vivi, ma anche sui loro metaboliti, geni e prodotti genici.

Con la definizione "**lotta biologica**" s'intende la lotta contro gli organismi nocivi mediante metodi biologici, pertanto senza ricorrere ad agro-farmaci di tipo chimico-sintetico. A questo scopo, si favoriscono, ad esempio, i nemici naturali o si liberano intenzionalmente gli animali utili. Anche i microrganismi come funghi e batteri vengono impiegati contro gli organismi nocivi. In senso lato, la lotta biologica include le metodiche della *biotecnica*. Un esempio è costituito dall'irrorazione con sostanze di richiamo, i *feromoni*, con il metodo della confusione sessuale.

Oggi si realizzano **programmi di lotta biologica** utilizzando **virus**, **batteri**, **funghi** e sostanze da essi derivate che si ottengono per estrazione o anche per sintesi chimica. La lotta biologica rappresenta un metodo di controllo dei patogeni praticato in regime di agricoltura biologica. Tuttavia, la lotta "genetica" e la lotta integrata, metodi da molti considerati ascrivi-

bili alla lotta biologica, sono per ora incompatibili con l'agricoltura biologica. D'altro canto, l'uso dello zolfo e del rame, una pratica antiparassitaria consentita in agricoltura biologica, non rientra nella lotta biologica.

MICRORGANISMI AUTORIZZATI IN ITALIA NELLA LOTTA BIOLOGICA CONTRO I PARASSITI

Batteri

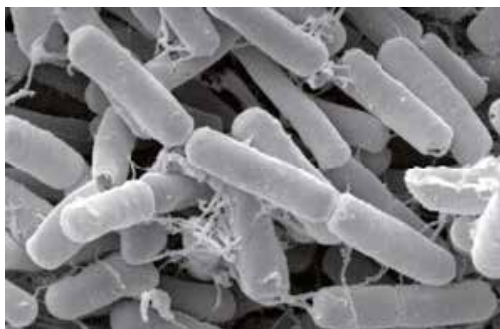
Bacillus thuringiensis

Le proprietà insetticide del *Bacillus thuringiensis* sono state studiate già agli inizi del 1900 (fu scoperto nel 1901 in Giappone e da Ernst Berliner nel 1911 in Germania) ed i prodotti a base di *Bacillus thuringiensis* sono stati i primi insetticidi biologici a essere diffusamente impiegati per la difesa delle colture dagli inizi degli anni '60.

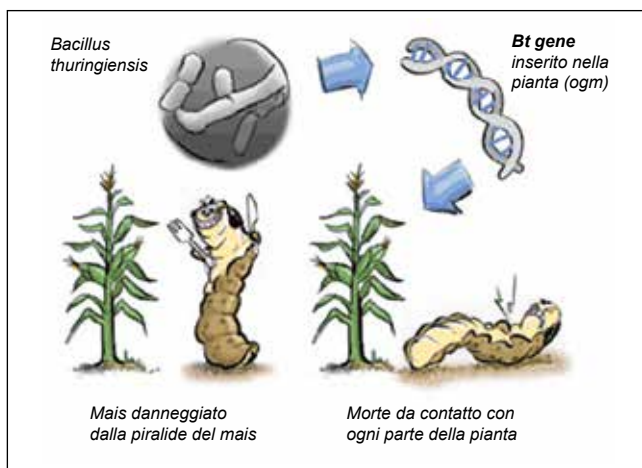
Il *Bacillus thuringiensis* è un batterio sporigeno (che vive nel terreno) di forma bastoncellare (bacillo), di tipo Gram-positivo, caratterizzato dalla costante presenza di un cristallo di natura proteica contenente una tossina, attiva nei confronti di numerose specie di insetti.

Quando viene ingerito mediante vegetali contaminati, il batterio sporula nell'ospite liberando tossine dette *tossine Bt* o più esattamente *delta-endotossine* che danneggiano il tratto digerente delle larve di Ditteri come le zanzare o causando nei bruchi di molti Lepidotteri una malattia paralitica.

A tutt'oggi sono state isolate più di 30 sottospecie del batterio attive contro molte specie di insetti, distinte per le differenti proprietà delle tossine liberate. Le principali sottospecie oggi impiegate nella lotta microbiologica sono le seguenti:



Colonia di Batteri del tipo *Bacillus thuringiensis*



B. thuringiensis var. *kurstaki* (sierotipo H 3a, 3b ceppo HD/1), impiegato essenzialmente per la lotta contro le larve dei lepidotteri;

B. thuringiensis var. *israelensis* (sierotipo H 14), utilizzato per il controllo delle larve delle zanzare nelle zone acquitrinose;

B. thuringiensis var. *temebrionis* (sierotipo H 8a, 8b) per combattere le larve dei coleotteri in orticoltura;

B. thuringiensis var. *aizawai* (sierotipo H 7), di minore interesse, impiegato per combattere la tignola della cera d'api.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, il *Bacillus thuringiensis* è attivo solamente per ingestione sulle larve, nei confronti delle quali l'efficacia risulta inversamente proporzionale all'età e quindi al peso.

Questo bacillo agisce senza bisogno di riprodursi all'interno dell'organismo ospite, ma come un vero e proprio veleno.

Le **tossine**, *innocue per l'uomo* anche per una questione di pH intestinale, sono prodotte sotto forma di cristalli, i quali si dissolvono in particolari condizioni di alcalinità spinta con valori di pH superiori a 9. Le tossine Bt sono perciò estremamente specifiche e danneggiano solo l'intestino di ben determinate specie d'insetti.

Vista la sua **manipolabilità genetica**, dal *Bacillus thuringiensis* è stato estratto infine il **gene che codifica per la tossina** e inserito in alcune **piante coltivate**, soprattutto **soia e mais**. In tal modo queste piante sono in grado di sintetizzarsi da sole la tossina divenendo "velenose" per gli imprudenti fitofagi che decidessero malauguratamente di nutrirsi. Un suo uso meno discusso è in **apicoltura**, dove viene impiegato nella lotta biologica alla tarma della cera.

Streptomyces griseoviridis

Streptomyces griseoviridis è un batterio dell'ordine degli *Actinomycet*i, presente in natura e non manipolato geneticamente. Gli *Actinomycet*i (o *Actinobacteria*) sono un raggruppamento di batteri Gram-positivi, filamentosi e con una crescita di tipo miceliare (analoghi a quella dei funghi). In particolare agisce in base a quattro tipi di meccanismi: la competizione per il substrato e lo spazio, l'antibiosi basata sulla produzione da parte degli antagonisti di metaboliti secondari tossici, il parassitismo, in cui l'antagonista compie il suo ciclo biologico



Micelio del batterio *Streptomyces griseoviridis*

co a spese dell'organismo fitopatogeno e, infine, la resistenza indotta, che ha luogo mediante l'attivazione da parte dell'antagonista dei meccanismi di resistenza della pianta.

L'impiego di *Streptomyces griseoviridis* in qualità di biofungicida deriva dall'osservazione delle proprietà soppressive possedute dalle torbe bionde di *Sphagnum* di origine finlandese nei confronti di diverse malattie delle piante.

Nel corso di studi condotti dall'Università di Helsinki venne osservato come gli *Streptomyces* costituissero una flora microbica abbondante in tali torbe. Uno dei ceppi (K61, che si ritrova comunemente in natura), risultato tra i più promettenti in prove di laboratorio, venne successivamente impiegato a livello industriale.

Streptomyces griseoviridis colonizza rapidamente le radici della pianta ospite, manifestando un'azione di antagonismo contro i funghi patogeni. La rapida colonizzazione dell'apparato

radicale da parte di questo tipo di batterio sottrae spazio vitale e nutrienti ai funghi patogeni che arrivano successivamente nel substrato; in alcuni casi può aggredire il micelio dei funghi patogeni grazie alla produzione di enzimi come la *chitinasi*, che disgregano le pareti delle *ife*. La produzione di diversi metaboliti ad attività antifungina inibisce lo sviluppo dei patogeni. Questo fenomeno è legato al controllo di patogeni minori e alla produzione di *auxine* (acido indolacetico) che determinano un maggiore sviluppo dell'apparato radicale.

Virus

I virus della famiglia *Baculoviridae* vengono normalmente impiegati in agricoltura biologica per il controllo di insetti fitofagi. Alla famiglia appartiene un unico genere, *Baculovirus*, suddiviso in tre sottogruppi A, B e C.

Alla prima suddivisione appartengono i virus della *poliedrosi nucleare* (NPV), al sottogruppo B i virus della *granulosa* (GV) e al sottogruppo C i virus privi di corpi d'occlusione, detti NOBV. La struttura del virione, di forma bastoncellare e dotato di membrana lipoproteica esterna, è comune a tutti i membri della famiglia.

Nella maggior parte dei *Baculoviridae*, i virioni sono inglobati in una matrice proteica di struttura cristallina in maniera individuale (GV) oppure in numero elevato (NPV). Il corpo d'occlusione ha la funzione di proteggere i virioni, che sono estremamente sensibili alla luce ultravioletta.

I *Baculovirus* si replicano solo nel nucleo delle cellule ospiti. Ogni singolo virus risulta piuttosto specifico e in grado di infettare poche specie nell'ambito di un unico o di un limitato numero di generi della stessa famiglia di insetti.

Un tipo di preparato assai utilizzato è a base di un *Baculovirus* specifico in grado di riprodursi a spese della *Carpocapsa* (*Cydia pomonella*). I prodotti del virus si ottengono, normalmente, manipolando le larve morte per infezione, allo scopo di ottenere una sospensione di inclusioni virali miscibili con acqua. Il virus viene



Larva matura di *Carpocapsa*
(*Cydia pomonella*)

purificato per centrifugazione e successivamente formulato con l'aggiunta di additivi specifici in modo da ottenere una sospensione concentrata.

Agisce solo sulle larve e svolge la sua attività esclusivamente per ingestione. Le larve a seguito dell'ingestione manifestano inizialmente diminuzione delle attività trofica e motoria e successivamente sono soggette a diverse patologie. Infine, le larve smettono di nutrirsi e muoiono nel giro di 3-5 giorni. I prodotti a base di *Baculovirus* si inseriscono normalmente nei programmi di difesa integrata e di Agricoltura Biologica delle colture autorizzate.

Funghi entomopatogeni

I **funghi entomopatogeni** sono particolarmente interessanti per la loro attività naturale di controllo nei confronti di **artropodi** dannosi in ambiente agricolo e forestale, e per la possibilità di essere impiegati in programmi di lotta biologica. Questi organismi presentano la capacità di penetrare attivamente il corpo degli artropodi attraverso la cuticola, l'apparato boccale ed altre aperture naturali.

Particolarmente interessante è la recente scoperta del comportamento endofita di alcuni funghi entomopatogeni, tra cui la *Beauveria bassiana*, della loro abilità a svilupparsi da *epifiti* e della loro azione antagonista nei confronti di funghi patogeni della pianta. Queste osservazioni aprono nuove prospettive di ricerca e di applicazione di questi versatili organismi.

Beauveria bassiana

La *Beauveria bassiana* fu scoperta dall'entomologo Agostino Bassi nel 1835 quando si rese conto che il baco da seta (*Bombix mori*) era affetto dal "mal del segno" causato appunto da questo fungo che prese da lui il nome specifico (*B. bassiana*). Interessante che già Bassi ipotizzò l'applicazione in agricoltura "contro le pesti dei campi coltivati".

Si tratta di un fungo ubiquitario, capace di attaccare numerose specie di insetti, appartenenti soprattutto all'ordine dei lepidotteri e dei coleotteri.

Le spore di questo fungo a contatto con l'insetto germinano, penetrando attraverso la cuticola tra le zone della testa e dei segmenti toracici, mediante una combinazione di azioni meccaniche ed enzimatiche.

Se l'infezione avviene poco prima che l'insetto compia la muta, essa si arresta, altrimenti il fungo continua a svilupparsi e le *ife* e *blastospore* di nuova formazione entrano nel sistema circolatorio dell'insetto.

A questo livello dell'infezione, inizia la produzione di tossine come la *beauvericina* e il *bassianolide*, che nel giro di 3-5 giorni portano alla morte della vittima.

Il fungo è un patogeno specifico di artropodi e non è infettivo, tossico o patogeno per i mammiferi; inoltre, non arrecava danno agli entomofagi utili. Nonostante i suoi numerosi vantaggi, va sottolineato comunque che la persistenza di *Beauveria bassiana* nel suolo risulta essere molto breve.

Quasi tutte le famiglie o determinati gruppi di insetti parassiti sono sensibili, fra cui:

- i Coleotteri come la Dorifera della patata (*Leptinotarsa decemlineata*), il Balanino del castagno (*Curculio elephas*) e delle nocciole (*Curculio nucum*);
- i Lepidotteri come la carpocapsa (*Cydia pomonella*), la Processionaria del pino (*Thaumatopea pityocampa*), la Piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*);
- le cavallette
- i Rincoti Omotteri (come Afidi, Aleurodidi, Cocciniglie)
- i Rincoti Eterotteri (come Tingidi e Pentatomidi).

Dopo la morte dell'insetto e in condizioni di elevata umidità (> 90%), possono comparire all'esterno del corpo delle efflorescenze *conidiche*, una sorta di schiuma bianca, che concorre ad una ulteriore diffusione dell'infezione del fungo.



Beauveria bassiana



Beauveria bassiana agisce da parassita in diverse famiglie di insetti

CONCLUSIONI

Le prospettive dell'uso dei microrganismi quali virus, batteri o funghi si deve considerare nel principale **obiettivo del controllo biologico**. Questo va inteso come la riduzione tramite uno o più organismi della densità di inoculo o delle capacità patogeniche di un parassita nel suo stato attivo o dormiente, riduzione che si verifica naturalmente o mediante la manipola-

zione dei fattori ambientali, della pianta ospite, di un antagonista, oppure mediante l'introduzione massiva di uno o più antagonisti (Cook e Baker, 1983).

Le strategie di applicazione del controllo biologico si basano essenzialmente su:

- contenimento della popolazione patogena, mediante interventi sul suolo o sull'ambiente;
- sfruttamento della resistenza della pianta ospite;
- controllo dell'infezione mediante l'utilizzo di agenti di biocontrollo (Gabriel e Cook, 1990).

La ricerca potrà individuare in futuro altre modalità e strumenti per un uso "equilibrato" dei mezzi biologici allo scopo di tenere sotto controllo le malattie delle piante, senza l'uso di nessuna sostanza chimica o inquinante che può essere dannoso per la salute umana.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barbarin, Alexis M.; Jenkins, Nina E.; Rajotte, Edwin G., Thomas, Matthew B. (15 settembre 2012) "Una valutazione preliminare del potenziale di *Beauveria bassiana*". ufficiale di invertebrati Patologia 111 (1): 82-85.
- 2) Celli Giorgio, Presentazione in Prefazione in Guida al riconoscimento degli organismi utili in agricoltura, Bologna, Centro Servizi Avanzati per l'Agricoltura (Centrale Ortofrutticola di Cesena) e dell'Osservatorio agroambientale di Cesena, 1991, pp. 9.
- 3) Cristina Serra, Le biotecnologie, Editori Riuniti, 1998.
- 4) Donald A. B. G. McNeil Jr., Fungo fatale che può essere di aiuto alla Guerra Globale contro la malaria, The New York Times, 10 giugno 2005.
- 5) Ferrari Mario; Marcon Elena; Menta Andrea, Lotta biologica. Controllo biologico ed integrato nella pratica fitoiatrica, Bologna, Edagricole, 2000.
- 6) Maniglia Giuseppe, Perricone Maria C.; Bissanti Guido (1988). Osservazioni sulla dinamica di popolazione di *Aleurothrixus floccosus* (Mask.). Atti Congresso Nazionale Italiano di Entomologia 15: 527-534.
- 7) Viggiani Gennaro, Lotta biologica ed integrata, Napoli, Liguori editore, 1977, pp. 507-533.
- 8) Lilia Alberghina; Enrico Cernia, Biotecnologie e bioindustria, UTET, 1996. ISBN 8802049696.
- 9) Vinci Giuliana; Restuccia Donatella, Pirro Francesca, Innovazione e Competitività: Biotecnologie e Sviluppo sostenibile, Roma, Società Editrice Universo, 2010.

PARTE SECONDA

TECNICA DI LABORATORIO

PARTE SECONDA

Capitolo 8

**METODI D'ANALISI PER LA RICERCA IN LABORATORIO DI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI CON PARTICOLARE
RIGUARDO ALLE DETERMINAZIONI PIÙ RICHIESTE PER I PRODOTTI VEGETALI**

ANNA MARIA FERRINI*, BRUNELLA APPICCIAFUOCO, ELISABETTA DELIBATO, MICHELE SONNESSA

**(Biologi del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare)
Istituto Superiore di Sanità
Roma**

***annamaria.ferrini@iss.it**

CONTENUTO

Indicazioni generali

- Preparazione dell'aliquota di prova e sospensione madre (prima diluizione)
- Allestimento delle diluizioni decimali successive
- Diluenti
- Indicazioni generali per i metodi di conta descritti ed espressione dei risultati

Schemi di lavoro in accordo ai relativi metodi orizzontali di riferimento:

- Conta di microrganismi – tecnica della Conta delle colonie a 30°C - **UNI EN ISO 4833-1:2013**
- **Conta di Stafilococchi coagulasi-positivi - *Staphylococcus aureus* e altre specie (terreno agar Baird-Parker)** - UNI EN ISO 6888-1:2004
- **Conta di Stafilococchi coagulasi-positivi - *Staphylococcus aureus* e altre specie (terreno agar al plasma di coniglio e fibrinogeno)** - UNI EN ISO 6888-2:2004
- **Ricerca di *Salmonella* spp.** - UNI EN ISO 6579:2004
- **Ricerca di *Listeria monocytogenes*** - UNI EN ISO 11290-1:2005
- **Conta di *Listeria monocytogenes*** - UNI EN ISO 11290-2:2005
- **Conta delle colonie di *Bacillus cereus* presunto** - UNI EN ISO 7932:2005
- **Conta delle colonie di *Clostridium perfringens*** - UNI EN ISO 7937:2005
- **Conta delle colonie di *Escherichia coli* beta-glucuronidasi positivo** - UNI EN ISO 16649-2:2010
- **Conta delle colonie di *Enterobacteriaceae*** - UNI EN ISO 21528-2:2010

Terreni e reagenti indicati nelle rispettive norme UNI EN ISO

Indicazioni generali

Preparazione dell' "aliquota di prova e sospensione madre (prima diluizione)

In condizioni di sterilità, pesare una massa "m" (in g) o un volume "v" (in ml) con un'incertezza di misura (IM) max di ±5% e rappresentativo del campione di prova. Aggiungere una quantità di diluente uguale a 9 x m (in grammi) o 9 x v (in ml).

Tale quantità può essere misurata in massa (IM ±5%) oppure in Volume (IM ±5%). Eventuali modifiche nel fattore di diluizione vanno tenute in conto nel calcolo ed espressione dei risultati. Di norma, utilizzare diluente a temperatura ambiente per evitare danni ai microrganismi dovuti ad improvvise variazioni di temperatura. Omogeneizzare in conformità alle raccomandazioni della ISO 7218. Se necessario, attendere 15 minuti perché le particelle di dimensioni maggiori possano depositarsi. In caso di conta delle spore, è necessario effettuare una scottatura per 10 min a 80°C (seguita da un rapido raffreddamento) della sospensione iniziale immediatamente dopo la sua preparazione.

Allestimento delle diluizioni decimali successive

Trasferire 1 ml della sospensione madre in una provetta contenente 9 ml di diluente sterile alla temperatura appropriata. Miscelare accuratamente (preferibilmente con un agitatore meccanico per un periodo compreso tra 5 e 10 sec) per ottenere una diluizione di 10⁻². Se necessario, ripetere il procedimento, partendo dalla diluizione 10⁻² e cambiando pipetta ad ogni diluizione successiva, fino ad ottenere le diluizioni appropriate per l'analisi del campione.

Iniziare la preparazione delle diluizioni decimali successive entro 30 minuti dalla preparazione della sospensione iniziale.

In caso di semina nella massa, il piastramento dell'agar deve essere effettuato entro 45 minuti dalla preparazione della sospensione iniziale.

Diluenti (composizioni di alcuni diluenti utilizzabili per l'analisi di prodotti vegetali)

Soluzione di peptone-sale (diluente di uso generale secondo UNI EN ISO 6887-1)

Digerito enzimatico della caseina	1,0 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua (ml)	1000,0 ml

pH dopo sterilizzazione = 7,0 ± 0,2 a 25°C.

Acqua peptonata tamponata (diluente di uso generale secondo UNI EN ISO 6887-1)

Digerito enzimatico di tessuti animali	10,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Fosfato bisodico idrogenato dodecaidrato (Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O)	9,0 g
Fosfato diidrogeno di potassio (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Acqua (ml)	1000,0 ml

pH dopo sterilizzazione = 7,0 ± 0,2 a 25°C.

Soluzione di peptone-sale con porpora di bromo cresolo (diluente per prodotti acidi secondo UNI EN ISO 6887-4)

Soluzione di peptone-sale (ml)	1000,0 ml
Porpora di bromo cresolo (soluzione alcolica allo 0,04%, per esempio soluzione di etanolo)	0,1 ml

Questa soluzione è indicata per l'analisi di alcuni prodotti acidi per effettuare la regolazione del pH senza l'impiego di sonde sterili. La porpora di bromocresolo è gialla a pH acido e vira a porpora a valori di pH maggiori di 6,8, quindi nell'utilizzo, è sufficiente aggiungere idrossido di sodio (NaOH) per ripristinare la colorazione porpora della sospensione.

Indicazioni generali per i metodi di conta descritti ed espressione dei risultati

Secondo la norma ISO 7218 i Laboratori che operano in regime di assicurazione della qualità secondo i principi della norma ISO 17025, per i metodi di conta in piastra possono utilizzare 1 piastra per diluizione quando vengano effettuate almeno due diluizioni successive. Viceversa, quando venga eseguita soltanto una diluizione o se il Laboratorio non opera in qualità, le tecniche di numerazione devono essere eseguite utilizzando 2 piastre/diluizione tenendo conto di questa differenza procedurale nel calcolo della conta.

Utilizzare piastre con conte comprese tra 10 e 300 colonie. Formula generale (conta delle colonie totali o tipiche):

$$N = \sum C/V(n_1 + 0,1n_2)d$$

dove:

N = numero di colonie (ufc/g o ml)

$\sum C$ = somma delle colonie su tutte le piastre selezionate per la conta

V = volume dell'inoculo in ogni piastra (ml)

n1 = numero delle piastre selezionate alla prima diluizione

n2 = numero delle piastre selezionate alla seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione selezionata

Arrotondare il risultato a 2 cifre significative.

Esprimere il risultato preferibilmente come un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per la appropriata potenza di 10, oppure come numero intero con due cifre significative. Riportare il risultato come il numero “N” di microrganismi per millilitro (prodotti liquidi) o per grammo (altri prodotti).

Conta delle colonie utilizzando una piastra per diluizione

Esempio:

prima diluizione considerata (10^{-2}): 168 colonie

seconda diluizione considerata (10^{-3}): 14 colonie

inoculo di 1 ml per piastra

$$N = \sum C/V \times 1,1 \times d = 168 + 14/1 \times 1,1 \times 10^{-2} = 182/0,011 = 165545 \text{ da arrotondare e riportare come } 1,7 \times 10^6 \text{ microrganismi per ml o g}$$

Conte basse

Come riportare il risultato se la piastra seminata con il campione o la sospensione utilizzata contiene meno di 10 colonie

N° colonie nella piastra alla 1a diluizione almeno 4 colonie da 3 a 1 colonia 0 colonie	Calcolo $N_s = C/V \times d$	Espressione del risultato Numero stimato di microrganismi /g o ml Microrganismi presenti ma $\leq 4/V \times d$ per g o ml Microrganismi $\leq a 1/V \times d$ per g o ml
--	---------------------------------	--

Metodi di calcolo dopo identificazione (utilizzando 1 piastra per diluizione)

Quando il metodo richiede una fase di identificazione, occorre procedere alla conferma di un dato numero di colonie presunte o sospette (in genere almeno 5) da ognuna delle piastre considerare per la conta delle colonie.

Di seguito nel testo con il termine “confermate” verrà indicato il numero di colonie effettivamente confermate su almeno 5 colonie testate/piastra.

Con il termine “identificate” verrà indicato il numero di colonie confermate per piastra estrapolato sulla percentuale delle conferme ottenute

Dopo questo passaggio, il numero “a” di colonie “identificate” (cioè che soddisfano i criteri della fase di conferma) per ciascuna piastra considerata, viene calcolato usando la formula:

$$a = (b/A) \times C$$

dove:

A = n° di colonie sospette sottoposte a identificazione per piastra

b = n° di colonie confermate per piastra

C = n° totale di colonie sospette contate per piastra

Il risultato ottenuto, e corrispondente al numero di colonie identificate per ciascuna piastra considerata, va arrotondato a numero intero.

Il n° di microrganismi identificati per ml o g di campione viene quindi calcolato sostituendo il n° di colonie identificate per piastra al n° di colonie totali per piastra nella formula di conta utilizzata.

	C		A		b		a	
	Colonie tot sospette per piastra		Colonie sospette testate per piastra		Colonie confermate per piastra		Colonie identificate per piastra	
1 ^a diluizione 10 ⁻³	66		8		6		50	
2 ^a diluizione 10 ⁻⁴	4		4		4		4	

Esempio:

prima diluizione considerata (10⁻³): 66 colonie

seconda diluizione considerata (10⁻⁴): 4 colonie

inoculo di 1 ml / piastra

Dalla piastra alla prima diluizione vengono testate 8 colonie delle quali 6 vengono confermate. Per proporzione, il numero di colonie identificate su questa prima piastra corrisponde a 50.

Dalla piastra alla seconda diluizione vengono testate 4 colonie che vengono tutte confermate. Per proporzione, il numero di colonie identificate su questa seconda piastra corrisponde a 4.

Questi valori ottenuti vengono quindi inseriti nella formula di calcolo, ottenendo:

$$N = \sum a / V \times 1,1 \times d = 50 + 4 / 1 \times 1,1 \times 10^{-3} = 49,090$$

Dopo arrotondamento il numero di microrganismi è 49 000 oppure 4,9 x 10⁴ per millilitro o per grammo di prodotto.

Casi speciali:

1° caso

Colonie totali per piastra		Presenza colonie tipiche o confermate
d ₁	10 ⁻²	>300 sì
d ₂	10 ⁻³	33 no

Espressione del risultato:

microorganismi per g o ml <1/V₂ x d₂ e > di 1/V₁ x d₁ cioè microorganismi < 1000 e > 100 /ml o g di prodotto

2° caso

Colonie totali per piastra		Presenza colonie tipiche o confermate
d ₁	10 ⁻²	>300 no
d ₂	10 ⁻³	33 no

Espressione del risultato:

microorganismi per g o ml <1/V₂ x d₂ cioè microorganismi < 1000/ml o g di prodotto

Conta delle colonie utilizzando due piastre per diluizione

Per la validità del risultato , si ritiene necessario contare piastre con un numero massimo totale di 300 colonie (numero massimo contabile di colonie tipiche o presunte = 150 / piastra)

Esempio:

prima diluizione considerata (10⁻²): 168 e 215 colonie
seconda diluizione considerata (10⁻³): 14 e 25 colonie

$$N = \sum C/V \times 2,2 \times d = 168 + 215 + 14 + 25 / 1 \times 2,2 \times 10^{-2} = 422 / 0,022 = 19.182 \text{ da arrotondare come } 19.000 \text{ oppure } 1,9 \times 10^4 \text{ microorganismi per ml o g}$$

Conte basse

Come riportare il risultato se entrambe le due piastre seminate con il campione o la sospensione iniziale o la prima diluizione utilizzata contengono meno di 10 colonie

N° colonie in entrambe le piastre alla prima diluizione	Calcolo	Espressione del risultato
almeno 4 colonie	$N_s = \frac{\sum C}{V} \times n \times \frac{1}{d}$	Numero <u>stimato</u> di microorganismi per g o ml
0 colonie		Microorganismi <u>inferiori</u> a 1/V x d per g o ml

dove:

ΣC = somma delle colonie contate su entrambe le piastre

V = volume dell'inoculo applicato su ciascuna piastra, in millilitri

n = n° di piastre considerato (in questo caso = 2)

d = fattore di diluizione

Esempio:

Il risultato di una conta di 8 e 9 colonie alla prima diluizione considerata (10^{-2}) è ottenuto da:

$N_s = 8 + 9/1 \times 2 \times 10^{-2} = 17/0,02 = 850$ quindi il numero stimato di microrganismi è 850 oppure $8,5 \times 10^2$ per ml o g

Metodi di calcolo dopo identificazione o conferma (utilizzando 2 piastre/diluizione)

Analogamente a quanto sopra descritto per la conta effettuata con una piastra per diluizione, procedere alla conferma di almeno 5 colonie sospette per ciascuna piastra considerata per la conta delle colonie (= totale almeno 20 colonie).

Esempio:		C	A	b	a
		Colonie tot sospette per piastra	Colonie sospette testate per piastra	Colonie confermate per piastra	Colonie identificate per piastra
1a diluizione	10 ⁻³ 1° piastra	66	8	6	50
	2° piastra	80	9	6	53
2a diluizione	10 ⁻⁴ 1° piastra	4	4	4	4
	2° piastra	7	5	4	6

I valori ottenuti (a) vengono quindi inseriti nella formula di calcolo, ottenendo:

$$N = \sum a / V \times 2,2 \times d = 50 + 53 + 6 + 4 / 1 \times 2,2 \times 10^{-3} = 51.364$$

Dopo arrotondamento il numero di microorganismi è 51 000 oppure 5,1 x 10⁴ per millilitro o per grammo di prodotto.

Casi speciali

1 caso		Colonie totali per piastra	Presenza colonie tipiche o confermate
d ₁	10 ⁻²	>300	sì
		>300	sì
d ₂	10 ⁻³	33	no
		35	no

Espressione del risultato:

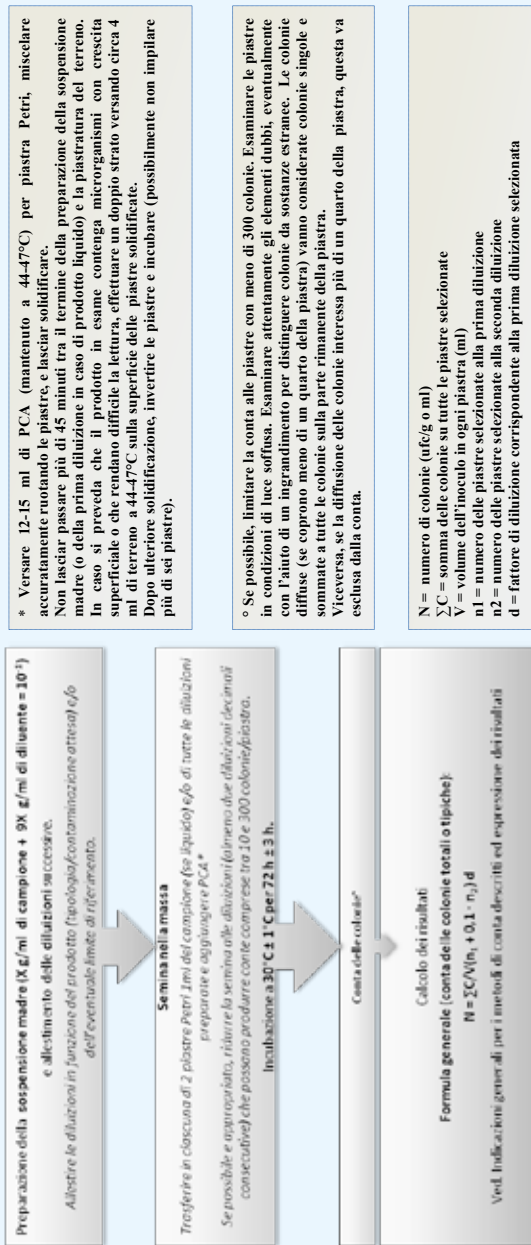
microorganismi per g o ml <1/V₂ x d₂ e > di 1/V₁ x d₁ cioè microorganismi < 1000 e > 100 per ml o g di prodotto

2 caso		Colonie totali per piastra	Presenza colonie tipiche o confermate
d ₁	10 ⁻²	>300	no
		>300	no
d ₂	10 ⁻³	33	no
		35	no

Espressione del risultato:

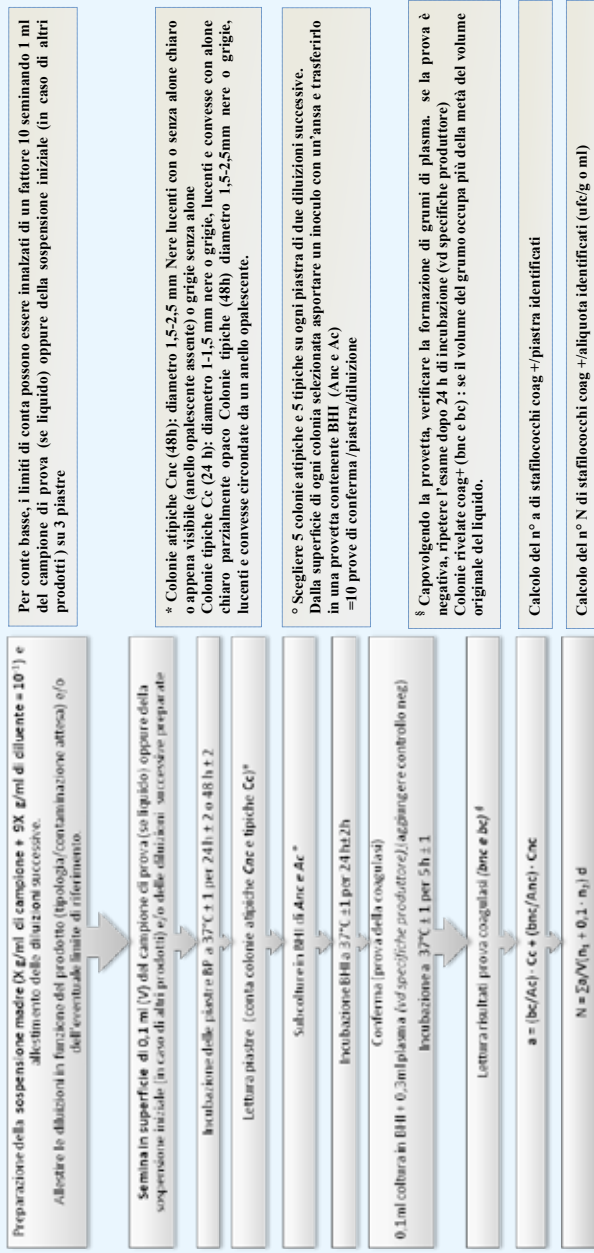
microorganismi per g o ml <1/V₂ x d₂ cioè microorganismi < 1000 per ml o g di prodotto

Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 4833-1:2013 per la conta di microrganismi - Tecnica della conta delle colonie a 30°C



Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 4833-1:2013 alla quale l'utilizzatore deve comunque fare riferimento.

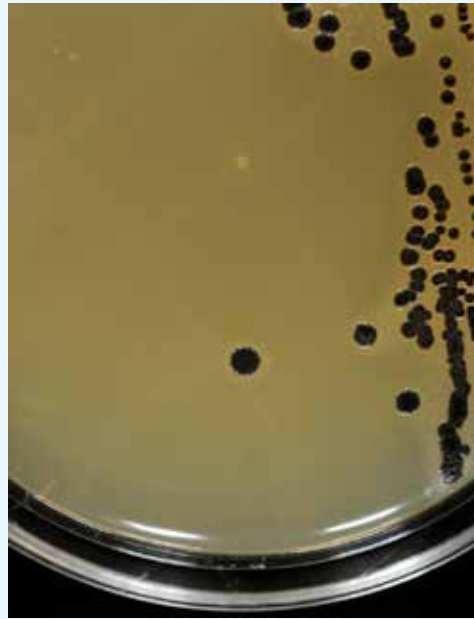
Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 6888-1:2004 per la conta di Stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie).
 Tecnica che utilizza il terreno agar Baird-Parker



n° di piastre	Colonie atipiche tipiche	Conta colonie/piastra (Cnc) (Cc)	N° colonie subcolturate in BHI (Anc) (Ac)	Colonie rivelate coag+/ (bnc) (bc)	N° stafilococchi coag+/piastra identificati	N° stafilococchi coag+ identificati (ufe/g o ml)
1 ^a diluizione(d)	n ₁				a 1 ^a dil	N
2 ^a diluizione	n ₂				a 2 ^a dil	

Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 6888-1:2004 alla quale l' utilizzatore deve comunque fare riferimento.

Coltura di 48 h di *S. aureus* coagulasi positivo su Baird Parker (+ egg yolk tellurite) su piastra da 6 cm

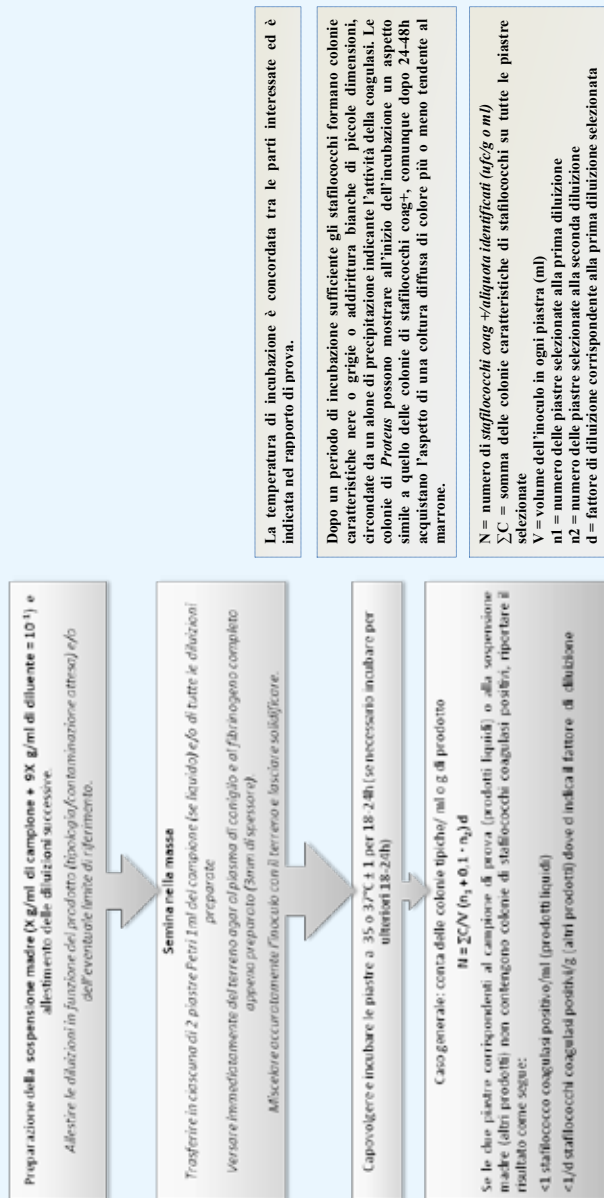


Le colonie tipiche presentano diametro di 1,5-2,5 mm, colore nero o grigio, aspetto lucente e forma convessa e sono circondate da un anello opalescente.

Test di conferma della coagulasi (ripresa dopo 5 ore di incubazione a 37°C).

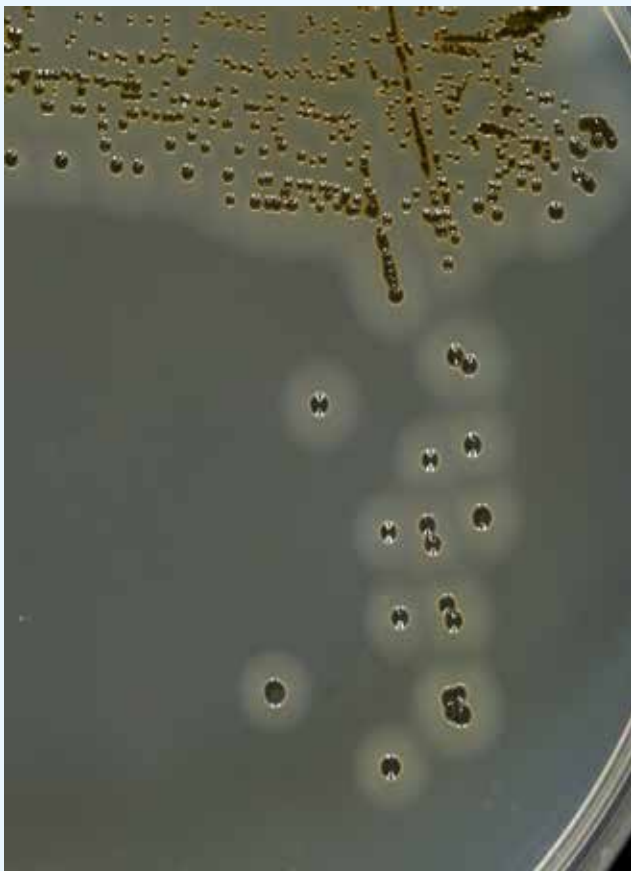


Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 6888-2:2004 per la conta di Stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie) -
Tecnica che utilizza il terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno



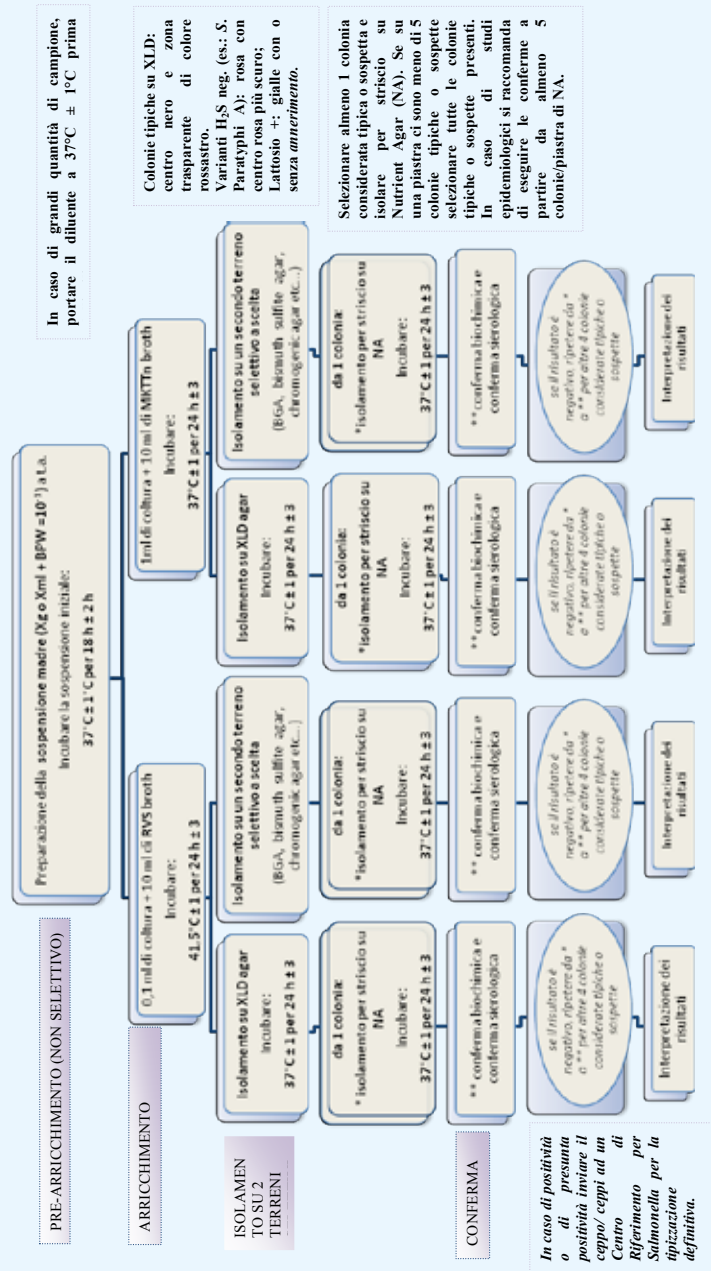
Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 6888-2:2004 alla quale l'utilizzatore deve comunque fare riferimento.

Coltura di 48h di *S. aureus* coagulasi positivo su Baird Parker al plasma di coniglio e al fibrinogeno



L'attività dell'enzima coagulasi è evidenziata direttamente sulla piastra da un alone opaco intorno alle colonie grigio-nere (ripresa fotografica su fondo nero).

Schema di lavoro per la ricerca di *Salmonella* spp. (parte 1: schema generale)



Espressione dei risultati: presenza o assenza di *Salmonella* spp. in Xg o in Xml

Schema di lavoro per la ricerca di *Salmonella* spp. (parte 2: conferma)
PROCEDERE ALLA CONFERMA BIOCHIMICA E SIEROLOGICA DI UNA COLONIA/PIASTRA DI NUTRIENT AGAR

TSI agar a becco di clarino
(37°C ± 1 °C per 24 h ± 3 h)

Culture tipiche di *Salmonella*: superficie rossa, fondo giallo (acido da glucosio) con formazione di gas. (Nota: *Salmonella* lattosio +; superficie gialla). Nel 90 % dei casi si nota annerimento dell'agar per formazione di idrogeno solforato

Conferma

Prove biochimiche differenziali: ureasi, lisina decarbossilasi, β-galattosidasi, produzione di acetoina, produzione di indolo. Per i dettagli vedere EN/ISO 6579.
In alternativa, possono essere utilizzati kit commerciali per il cui utilizzo si rimanda alle specifiche del produttore.

Interpretazi

	S. Typhi		S. Paratyphi A		S. Paratyphi B		S. Paratyphi C		Altri ceppi	
	reazione	%	reazione	%	reazione	%	reazione	%	reazione	%
TSI acido da glucosio	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
TSI gas da glucosio	-	0	+	100	+	100	+	100	+	92
TSI acido da lattosio	-	2	-	100	-	100	-	100	-	1
TSI acido da saccarosio	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
TSI idrogeno solforato	+	97	-	10	+	10	+	10	+	92
Idrolisi dell'urea	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1
Decarbossilazione della lisina	+	98	-	0	-	0	-	0	-	95
Reazione della β-galattosidasi	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2 ^a
Reazione di Voges-Proskauer (VP)	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
Produzione di indolo	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1

a: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* può dare reazione + o - al lattosio ma è sempre β-galattosidasi +

- 1) Eliminazione dei ceppi autoagglutnanti
- 2) Ricerca della presenza degli antigeni O-, Vi- e H-

Esequire 1) e 2) utilizzando una stessa colonia. La fase 2 viene eseguita solo su ceppi NON
In commercio sono disponibili sieri anti-Vi e sieri anti-O e anti-H sia monovalenti che polivalenti.

Conferma

Interpretazi	Auto - agglutinazione		Reazioni sierologiche		Interpretazione	
	tipiche	No	Positività agli antigeni O, Vi e H	Ceppi considerati <i>Salmonella</i>		
tipiche	No	No	Negatività a tutte le reazioni	Ceppi considerati <i>Salmonella</i>		
tipiche	Si	Si	Non testati	Ceppi presunti <i>Salmonella</i>		
non tipiche	No/Si	No/Si	Positività agli antigeni O, Vi e H	Ceppi non considerati <i>Salmonella</i>		
non tipiche	No/Si	No/Si	Negatività a tutte le reazioni	Ceppi non considerati <i>Salmonella</i>		

IN CASO DI RISULTATO NEGATIVO LO SCHEMA INDICATO VA RIPETUTO TAL QUALE SU ALTRE 4 COLONIE/PIASTRA DI NUTRIENT AGAR



Terreno XLD non inoculato



Salmonella Typhimurium su XLD



Salmonella Enteritidis su XLD



Terreno BGA non inoculato



Salmonella Enteritidis su BGA

(ingrandimento maggiore)



Salmonella Enteritidis su BGA

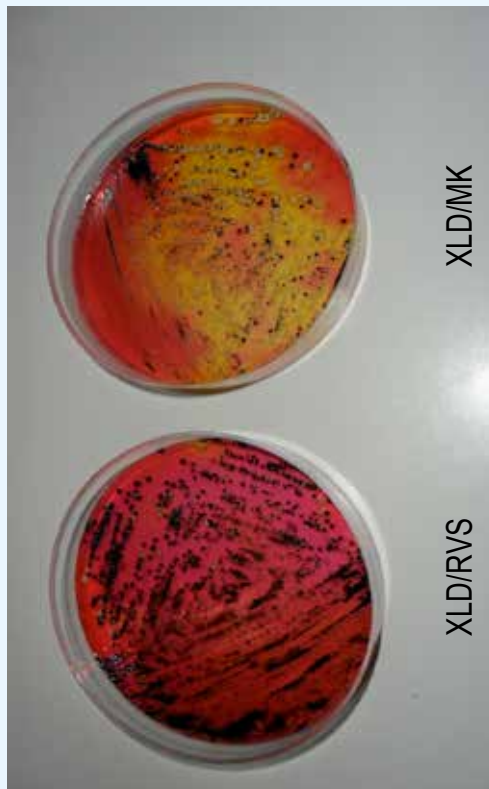


Salmonella Typhimurium su BGA

Aspetto di *Salmonella* Typhimurium isolata da uno stesso campione reale (un vegetale) su XLD.

Piastra a sinistra: coltura ottenuta da arricchimento selettivo in RVS.

Piastra a destra: coltura ottenuta da arricchimento selettivo in MKTTn.



Notare la migliore selettività ottenuta da RVS rispetto al MKTTn nella matrice vegetale.



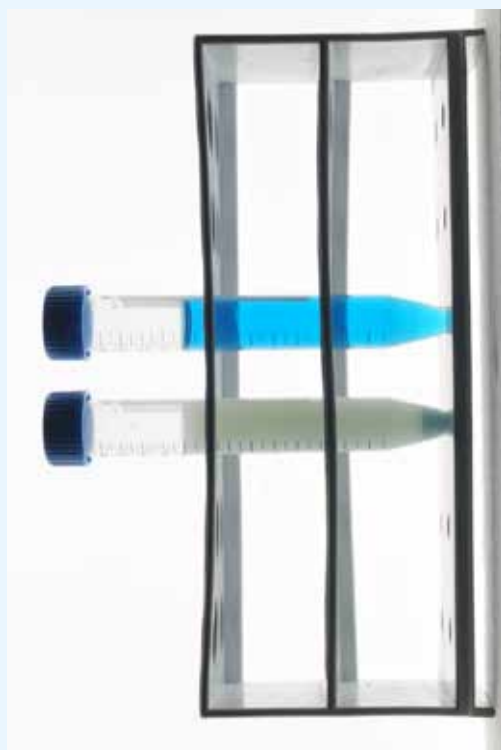
Prova di conferma biochimica per l'utilizzazione di 3 zuccheri (lattosio, saccarosio e glucosio) su TSI.
Da sinistra: terreno non inoculato, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium.

***Salmonella* Enteritidis:**

Fondo giallo glucosio positivo
Fondo nero produzione idrogeno solforato
slant rosso saccarosio / lattosio negativo

***Salmonella* Typhimurium:**

Fondo nero produzione idrogeno solforato
slant rosso saccarosio / lattosio negativo



Terreni non inoculati per l'arricchimento selettivo: MKTn a sinistra e RVS a destra.

Schema di lavoro per la NUMERAZIONE di *Listeria monocytogenes*



^a utilizzato come diluente, senza l'aggiunta di agenti selettivi, quando entrambi i metodi (ISO 11290/2) sono eseguiti sullo stesso campione. Gli agenti selettivi sono aggiunti alla sospensione madre dopo l'allestimento delle diluizioni decimali. L'uso di questa procedura dovrebbe essere riportata nel rapporto di prova.

^b Spatolare l'inoculo evitando di toccare il bordo della piastra e lasciarlo assorbire per 15 s a t.a. Invertire le piastre e incubare.

^c Per stimare bassi numeri di *Listeria monocytogenes*, distribuire 1,0 ml (V) della sospensione iniziale su una piastra Petri da 140 mm o su tre piastre da 90 mm, in duplicato.

^d Per laboratori che operano in regime di assicurazione della qualità è possibile inoculare soltanto una piastra per ogni diluizione in accordo con ISO/IEC

^e Se una piastra contiene < di 5 colonie presuntive (A), selezionarle tutte per la conferma.

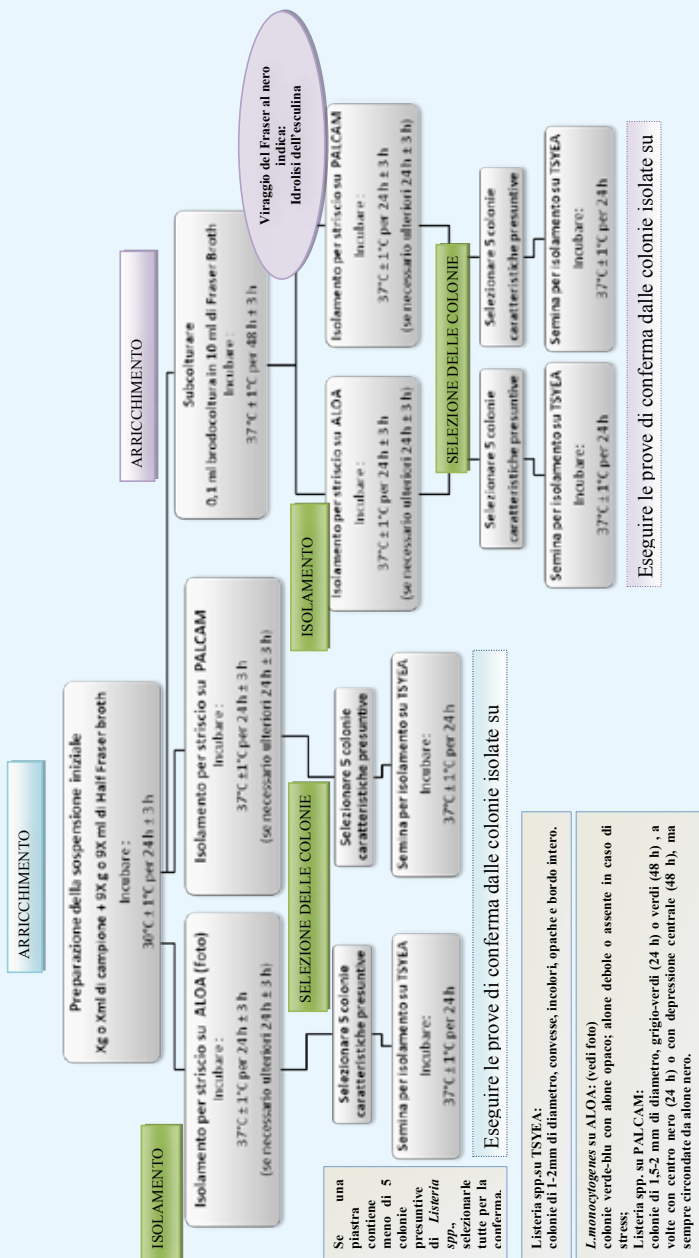
^f Considerare le piastre di due diluizioni successive contenenti meno di 150 colonie presuntive, una delle quali contenente almeno 15 colonie. Scegliere le piastre di due diluizioni successive con un n° di colonie tali da avere una conta più agevole.

a = n° di colonie di *L. monocytogenes* per piastra (Arrotondare a numero intero)
b = n° di colonie selezionate e confermate come *L. monocytogenes* per piastra
A = n° di colonie caratteristiche presuntive sottoposte a conferma per piastra
C = n° totale di colonie caratteristiche presuntive contaminate per piastra

¹ n₁ = n° di piastre alla prima diluizione; n₂ = n° di piastre alla seconda diluizione;
d = fattore di diluizione di n₁.

² Se le due piastre a livello della prima diluizione contengono meno di 15 colonie conformi, calcolare la media aritmetica (y) delle colonie conformi sulle due piastre.

Schema di lavoro per la RICERCA di *Listeria monocytogenes*



Espressione del risultato: presenza o assenza di *Listeria monocytogenes* in X g o in X ml di campione testato

ALO (terreno selettivo primario) e PALCAM (terreno selettivo secondario): è consentito l'uso di terreni con identica formulazione.

Schema di lavoro per la conferma di *Listeria monocytogenes*

Conferma di *Listeria* spp.

A) CATALASI	Dispensare una goccia di H ₂ O ₂ su un vetrino porta oggetti. Stemperarvi l' colonia prelevata da TSYEA. L'immediato sviluppo di ossigeno gassoso indica una reazione positiva. <i>Listeria</i> spp. è catalasi +.
B) MOTILITÀ	1) Trasferire una colonia da TSYEA a TSYEB. Incubare a 25°C per 8-24 h (fino a intorbidimento del terreno). Trasferire una goccia un'ansa su un vetrino da microscopio, coprire con un coprioggetto ed esaminare al microscopio. <i>Listeria</i> spp., <i>bastocella</i> mobili. Nota: culture cresciute al di sopra del 25°C potrebbero perdere la mobilità. Oppure: 2) Seminare una colonia per infusione da TSYEA a Motility Agar. Incubare a 25°C per 48 h. La crescita di <i>Listeria</i> spp. intorno al canale di infusione produce un tipico aspetto a ombrello.
C) Colorazione di Gram	Eseguire la colorazione di Gram su una colonia prelevata da TSYEA. <i>Listeria</i> spp. è Gram+ di forma bastoncellare.

Conferma di *Listeria monocytogenes*

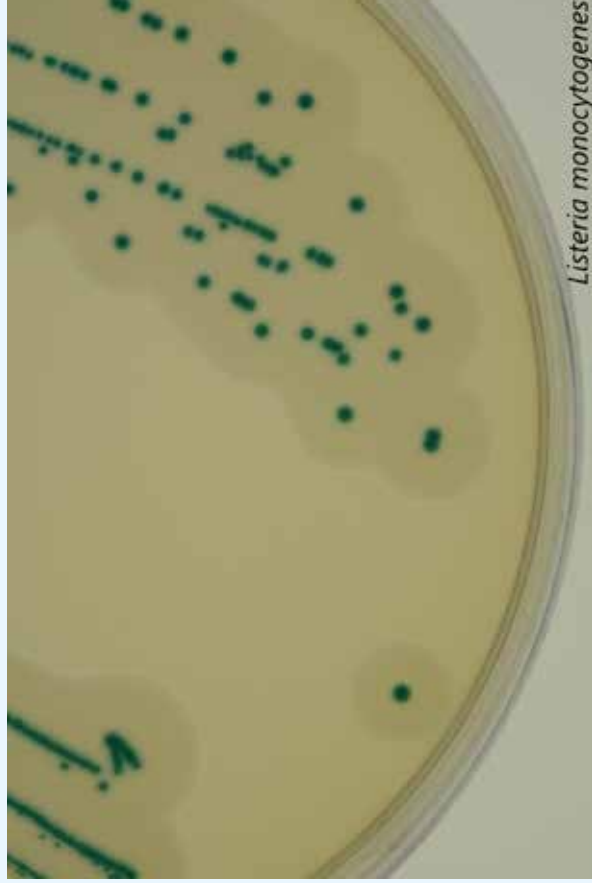
D) EMOLISI (vedi foto)	1) Seminare per infusione una colonia prelevata da TSYEA in sheep blood agar. Includere un controllo positivo (<i>L. monocytogenes</i>) e un controllo negativo (<i>L. innocua</i>), incubare a 37°C per 24 h ± 2 h. <i>Listeria monocytogenes</i> mostra caratteristiche di β-emolisi differenti da altre specie emolitiche del genere <i>Listeria</i> . Oppure: 2) Trasferire una colonia da TSYEA in 150µl di TSYEB. Incubare a 37°C per 2 h. Aggiungere 150 µl di una sospensione di emazie da sheep blood. Incubare a 37°C per 15' 60', refrigerare a 3°C ± 2 per circa 3 h. Esaminare per l'attività emolitica. Se la reazione non è chiara, rimettere a 3°C ± 2 per altre 3 h.
E) UTILIZZO DEI CARBOIDRATI (vedi foto)	Possono essere utilizzati kit commerciali per la conferma biochimica di <i>Listeria monocytogenes</i> e per l'utilizzo si rimanda alle specifiche del produttore.
F) CAMP TEST (vedi foto)	Eseguire strisci su agar sangue secondo il modello riportato in figura. Incubare a 37°C per 18-24 h. Viene considerata reazione positiva una pronunciata zona di β-emolisi all'intersezione del ceppo test con ognuna delle culture di <i>S. aureus</i> (NCTC 1803 o ATCC 25923) e <i>R. equi</i> (NCTC 1621 o ATCC 6939). Una reazione positiva con <i>S. aureus</i> appare come una piccola zona di aumento di emolisi che si estende solo fino a 2 mm dal ceppo test ed entro la debole zona emolitica dovuta alla crescita della cultura di <i>S. aureus</i> , mentre la reazione positiva con <i>R. equi</i> si osserva come un'ampia (dal 5mm ai 10 mm) punta di freccia di emolisi. La reazione è considerata negativa se una piccola zona di debole emolisi si estende solo fino a circa 1 mm all'intersezione del ceppo test con la zona di diffusione della cultura di <i>R. equi</i> . <i>Listeria monocytogenes</i> mostra una reazione <i>S. aureus</i> e <i>R. equi</i> (una sottile zona di emolisi all'intersezione con la cultura di <i>R. equi</i>).

SPECIE	EMOLISI	PRODUZIONE DI		CAMP TEST	
		ACIDO	XILOSIDO	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovi</i>	(++)	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	V	-	-	-

Test di conferma	colonia				
	1	2	3	4	5
A) Catalasi					
B) Motilità					
C) Gram staining					
D) β-emolisi					
E) Carboidrati					
F) CAMP test					

^a = Descritti rari isolati di *L. monocytogenes* Rammosio-
^b negativi
^c = Descritti rari ceppi di *L. monocytogenes* non emolitici
V = REAZIONE VARIABILE
(+) = REAZIONE DEBOLE
(++) = Attività emolitica più forte
+ = POSITIVITÀ > 90%
- = NESSUNA REAZIONE

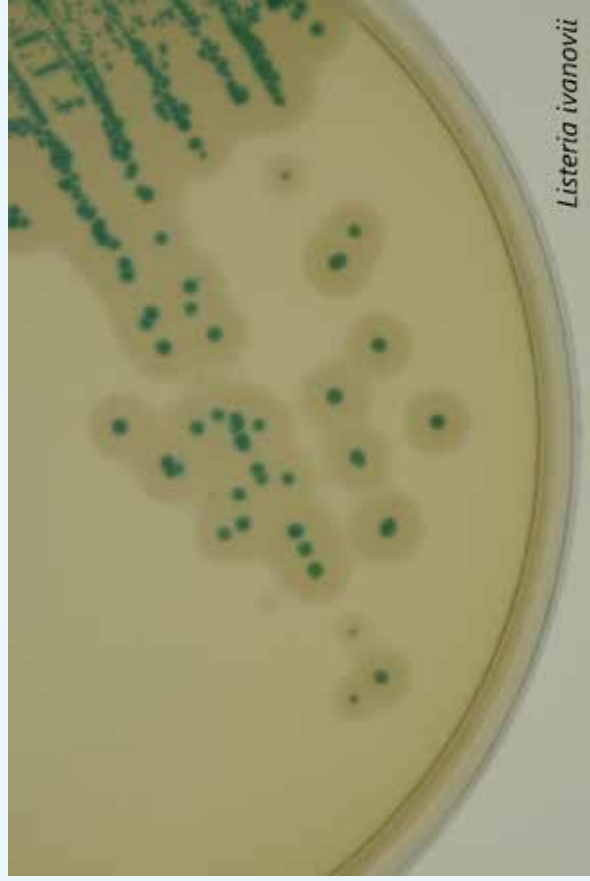
Isolamento di *Listeria monocytogenes* su ALOA



Un componente nella formulazione dell'ALOA è il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside, un substrato enzimatico per una β -D-glucosidasi, espressa da tutte le *Listeria* spp. Un secondo substrato, L- α -fosfatidilinositolo, è idrolizzato dalla fosfolipasi C fosfatidil inositolo specifica (PI-PLC), un fattore di virulenza espresso soltanto dalle due specie patogene *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii*. Colonie tipiche sono circondate da una zona chiara di precipitazione.

NOTA: nessuna differenza tra *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* su ALOA (vedi isolamento di *Listeria ivanovii* su ALOA).

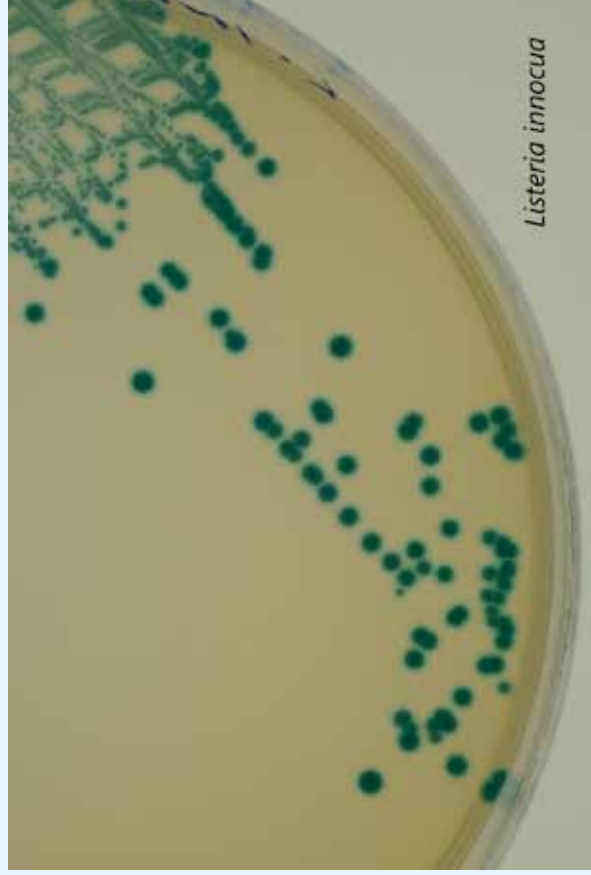
Isolamento di *Listeria ivanovii* su ALOA



Un componente nella formulazione dell'ALOA è il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside, un substrato enzimatico per una β -D-glucosidasi, espressa da tutte le *Listeria* spp. Un secondo substrato, L- α -fosfatidilinositolo, è idrolizzato dalla fosfolipasi C fosfatidil inositolo specifica (PI-PLC), un fattore di virulenza espresso soltanto dalle due specie patogeniche *Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes*. Colonie tipiche sono circondate da una zona chiara di precipitazione.

NOTA: nessuna differenza tra *Listeria ivanovii* e *Listeria monocytogenes* su ALOA (vedi isolamento di *Listeria monocytogenes* su ALOA).

Isolamento di *Listeria innocua* su ALOA

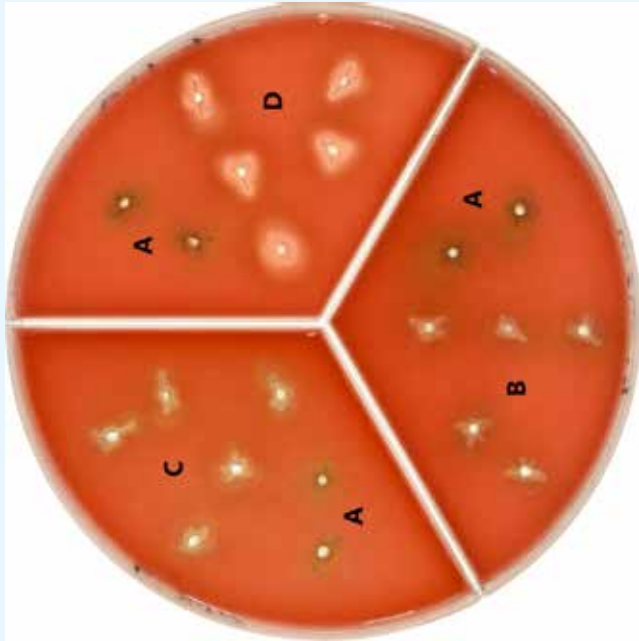


Un componente nella formulazione dell'ALOA è il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucopiranoside, un substrato enzimatico per una β -D-glucosidasi, espressa da tutte le *Listeria* spp.

Colonie tipiche prive di precipitazione per *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*.

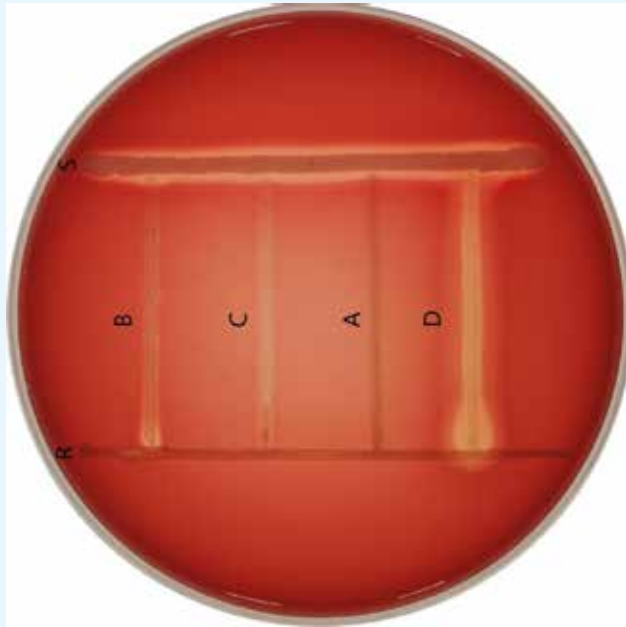
NOTA: vedere differenza con *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* su ALOA.

Beta emolisi: *Listeria* spp.



Particolare dell'attività β -emolitica di tre specie del genere <i>Listeria</i> L'emolisi è visibile come zona di chiarificazione intorno al punto di infissione e di lesione del terreno (Columbia Agar con il 5% di sangue di montone)	
A	<i>Listeria innocua</i> Specie non emolitica e non patogena. (controllo A nei tre settori della piastra).
B	<i>Listeria monocytogenes</i> L'attività emolitica è dovuta all'azione della proteina listeriolisina (LLO).
C	<i>Listeria seeligeri</i> L'attività emolitica è dovuta all'azione della proteina seeligerolisina (SLO). Attività di β -emolisi più debole se comparata alle altre due specie emolitiche, come risultato di una bassa espressione del gene codificante.
D	<i>Listeria ivanovii</i> L'attività emolitica è legata all'espressione della proteina ivanolisina (ILO). <i>L. ivanovii</i> mostra una β -emolisi più accentuata, per l'espressione di una sfingomielinasi non presente nelle altre specie.

CAMP test: *Listeria* spp.

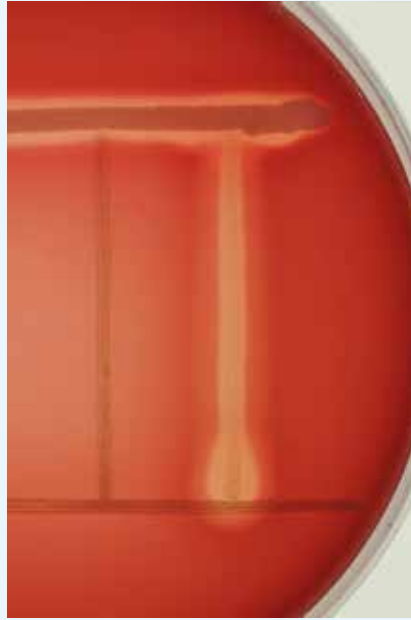


R	<i>Rhodococcus equi</i> (ATCC 6939)
S	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
B	<i>Listeria monocytogenes</i> S ⁺ /R ⁻
C	<i>Listeria seeligeri</i> S ⁺ /R ⁻ Visibile una β -emolisi lungo lo striscio ma assenza di emolisi sinergica all'intersezione con i ceppi ATCC
A	<i>Listeria innocua</i> Nessuna attività emolitica
D	<i>Listeria ivanovii</i> S ⁺ /R ⁺

Particolare CAMP test: *Listeria* spp.

Listeria monocytogenes

Listeria seeligeri



Rhodococcus equi
Rhodococcus equi

aureus

Staphylococcus aureus
Staphylococcus

Listeria innocua

Listeria ivanovii

Galleria API *Listeria* spp.: fermentazione dei carboidrati



Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 7932:2005 per la conta di *Bacillus cereus* presunto - Tecnica della conta delle colonie a 30 °C



Il termine "presunto" va mantenuto nell'espressione del risultato, perché i passaggi di conferma non permettono la distinzione tra *B. cereus* e altre specie correlate, benché meno frequenti.

Per conte basse, i limiti di conta possono essere innalzati di un fattore 10 sommando 1 ml su 3 piastre (in doppio) del campione di prova (se liquido) oppure della sospensione iniziale (in caso di altri prodotti).

Spatolare accuratamente l'inoculo il più velocemente possibile e lasciarlo assorbire nell'agar (mantenere le piastre 15' a t. a.)

* Scegliere le piastre di due diluizioni consecutive contenenti <150 colonie. Colonie presunte: larghe, rosa (assenza di fermentazione del mannitolo), circondate da una zona di precipitazione (produzione lecitinasi)

§ La concomitante presenza di numerosi m.o. fermentanti il mannitolo causa la produzione di acido e può interferire con la caratteristica colorazione rosa del *B. cereus*. Alcuni ceppi sono scarsi produttori di lecitinasi, e sviluppano colonie non circondate da zona di precipitazione, quindi anche colonie con questo aspetto dovrebbero essere sottoposte al test di conferma

Se sono presenti < 5 colonie caratteristiche/piastra, selezionare tutte le colonie presunte.

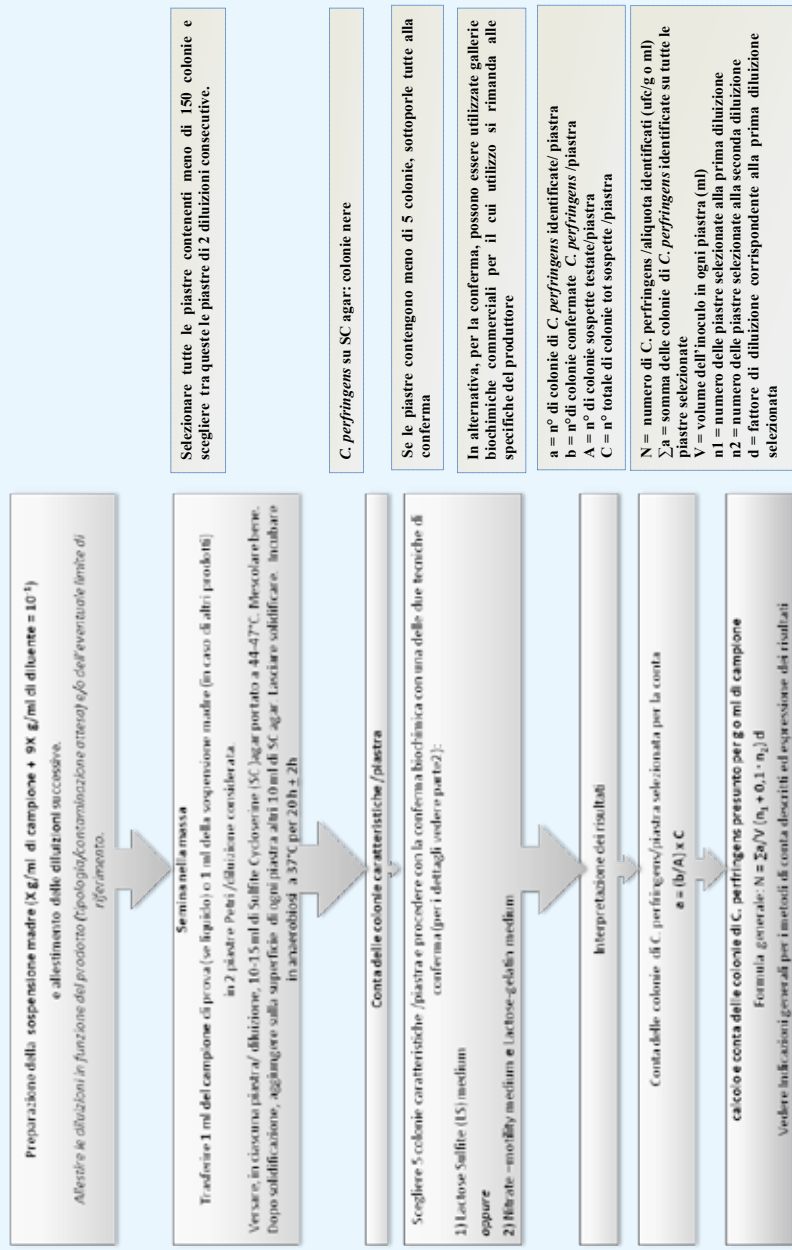
Se le colonie non sono ben isolate, strisciare 5 colonie presunte su altrettante piastre di MYP agar completo (incubare a 30°C per 18-24 h), selezionare da ciascuna piastra almeno una colonia ben isolata (colore rosa) e procedere con la conferma (test di emolisi) per striscio, infissione o spot su agar sangue di montone in modo da ottenere una corretta interpretazione della reazione di emolisi. Incubare a 30°C per 24 h ± 2h

a = n° di colonie di *B. cereus* presunto identificate/piastra
b = n° di colonie confermate *B. cereus* presunto/piastra
A = n° di colonie sospette testate/piastra
C = n° totale di colonie tot sospette/piastra

Test	Risultati che confermano la presenza di <i>B. cereus</i> presunto
MYP agar	Crescita di colonie rosa circondate da un alone di precipitazione §
Test di emolisi	reazione positiva su agar sangue di montone (zona di emolisi di diametro variabile)

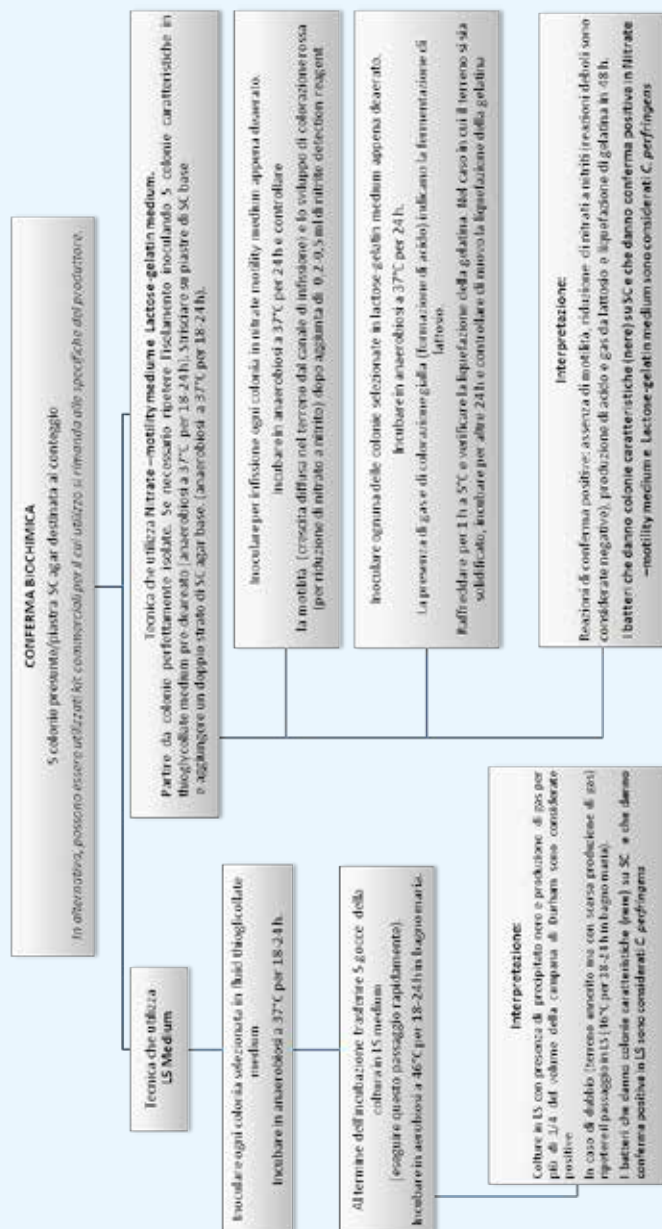
Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 7932:2005 alla quale l'utilizzatore deve comunque fare riferimento.

Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 7937:2005 per la conta delle colonie di *Clostridium perfringens* (parte 1: schema generale)

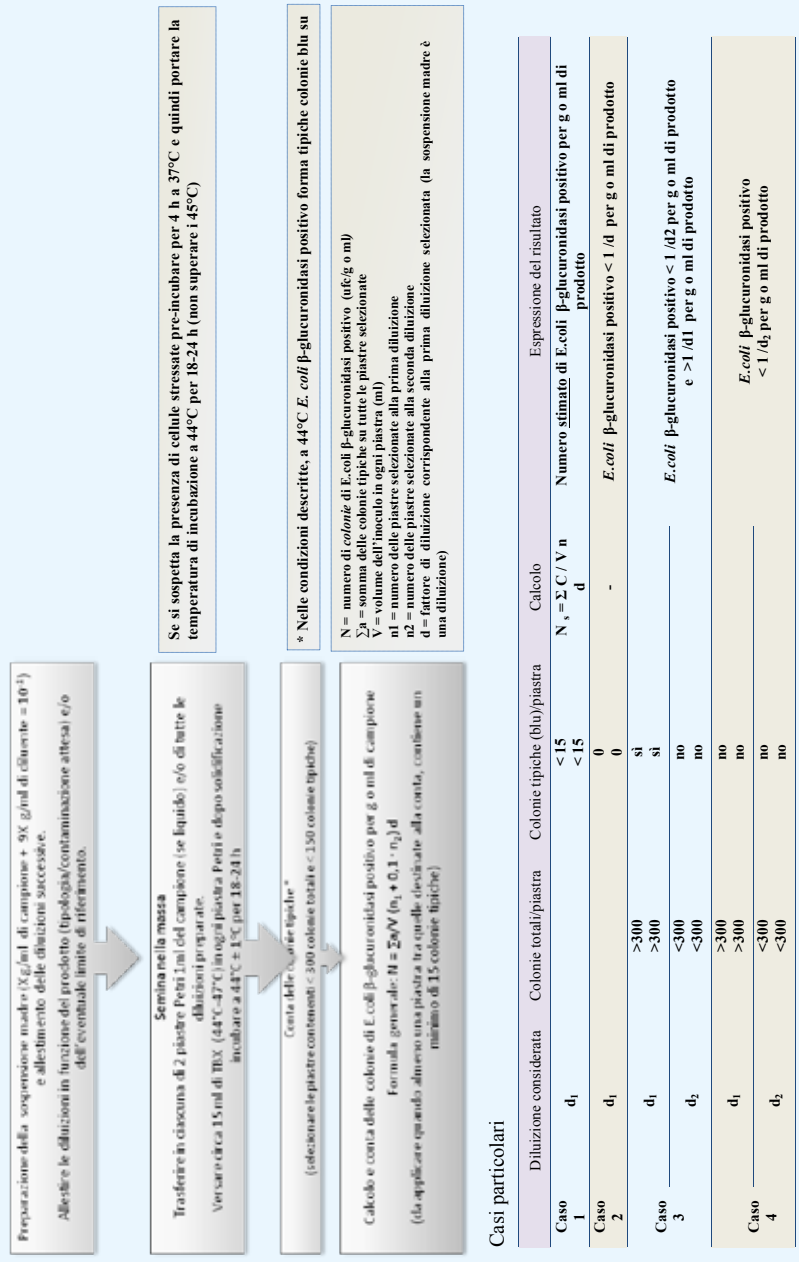


Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 7937:2005 alla quale l'utilizzatore deve comunque fare riferimento.

Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN 7937:2005 per la conta delle colonie di *Clostridium perfringens* (parte 2: conferma)



Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 16649-2:2010 per la conta delle colonie di *Escherichia coli* beta-glucuronidasi positivo

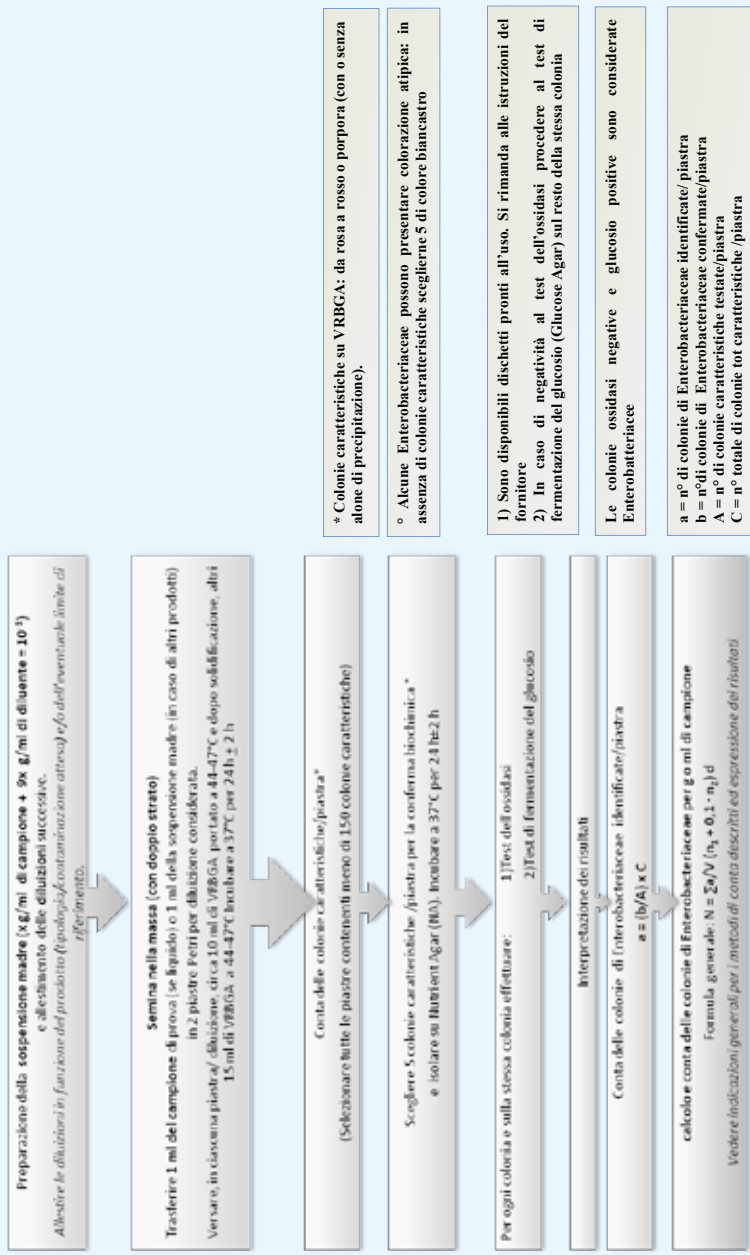


Casi particolari

Diluizione considerata		Colonie totali/piastra	Colonie tipiche (blu)/piastra	Calcolo	Espressione del risultato
Caso 1	d ₁	>300	<15	$N = \frac{\Sigma C}{V \cdot n} \cdot d$	Numero <u>stimato</u> di <i>E. coli</i> β-glucuronidasi positivo per g o ml di prodotto
Caso 2	d ₁	>300	<15		
Caso 3	d ₁	>300	si	-	<i>E. coli</i> β-glucuronidasi positivo < 1/d per g o ml di prodotto
	d ₂	<300	si		
Caso 4	d ₁	>300	no	-	<i>E. coli</i> β-glucuronidasi positivo < 1/d ₂ per g o ml di prodotto e > 1/d ₁ per g o ml di prodotto
	d ₂	<300	no		

Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 16649-2:2010 alla quale l'utilizzatore deve comunque fare riferimento

Schema di lavoro riferito alla norma UNI EN ISO 21528-2:2010 per la Conta delle colonie di Enterobacteriaceae



Il presente schema è realizzato al solo fine di consultazione e non ha valenza ufficiale. Pertanto non sostituisce né integra la norma UNI EN ISO 21528-2:2010 alla quale l'utilizzatore deve comunque fare riferimento.

TERRENI E REAGENTI INDICATI NELLE NORMATIVE STANDARD DI RIFERIMENTO

Parametri	Terreni e reagenti
Conta microrganismi a 30°C (UNI EN ISO 4833-1:2013)	Plate count agar (PCA)
	mPCA
Stafilococchi coagulasi positivi (UNI EN ISO 6888-1:2004)	Baird-Parker + egg yolk tellurite emulsion
	Brodo di infusione cuore-cervello
	Plasma di coniglio
Stafilococchi coagulasi positivi (UNI EN ISO 6888-2:2004)	Baird-Parker + RPF
<i>Salmonella</i> spp. (UNI EN ISO 6579:2004)	BPW
	Rappaport Vassiliadis Medium With Soya (RVS broth)
	Muller – Kauffman (MKTn)
	Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar)
	Brilliant Green Agar modified (BGA)
	Nutrient Agar (NA)
	Triple sugar/iron agar (TSI agar)
	Urea agar (Christensen) + Urea solution
	L-Lysine decarboxylation medium
	β-Galactosidase reagent (Buffer solution + ONPG solution)
	Reagenti per Voges-Proskauer (VP)
	VP medium
	Creatine solution (N-amidinosarcosine)
	1-Naphthol, ethanolic solution
	Potassium hydroxide solution
	Reagenti per indolo
	Tryptone/tryptophan medium
	Kovacs reagent
	Semi-solid nutrient agar
	Physiological saline solution
	Siero anti-O, siero anti-H, siero anti-Vi

Parametri	Terreni e reagenti
<i>Listeria monocytogenes</i> (UNI EN ISO 11290-1:2005)	Half Fraser broth base + Half Fraser selective supplement
	Fraser Broth base + Fraser selective supplement
	Agar Listeria in accordo a Ottaviani e Agosti (ALOA)
	PALCAM Agar base + Palcam selective supplement
	Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA)
	Tryptone soya yeast extract broth (TSYEB)
	Sangue defibrinato di montone
	Terreni di base per la utilizzazione dei carboidrati e relative soluzioni
	Motility agar
	CAMP (Christie, Atkins, Munch-Paterson) medium e ceppi <i>test</i>
	Soluzione di H ₂ O ₂ (3% m/m)
	Phosphate-buffered saline (PBS)
<i>Listeria monocytogenes</i> (UNI EN ISO 11290-2:2005)	BPW o HALF FRASER BROTH senza supplementi (vedi testo)
	Agar Listeria <i>according to</i> Ottaviani and Agosti (ALOA)
	Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA)
	Tryptone soya yeast extract broth (TSYEB)
	Sangue defibrinato di montone
	Terreni di base per la utilizzazione dei carboidrati e relative soluzioni
	Motility agar
	CAMP (Christie, Atkins, Munch-Paterson) medium e ceppi <i>test</i>
	Soluzione di H ₂ O ₂ (3% m/m)
	Phosphate-buffered saline (PBS)
<i>Bacillus cereus</i> presunto (UNI EN ISO 7932:2005)	Mammitol/egg yolk/polymyxin (MYP) agar
	Sheep blood agar

<i>Clostridium perfringens</i> (UNI EN ISO 7937:2005)	Sulfite-cycloserine agar (SC)
	Fluid thioglycollate medium
	Lactose sulfite medium (LS)
	Nitrate motility medium
	Lactose-gelatin medium
<i>Escherichia coli</i> β -glucuronidasi positivo (UNI EN ISO 16649-2:2010)	
	TBX
Enterobacteriaceae (UNI EN ISO 21528-2:2010)	VRBG agar
	Nutrient Agar (NA)
	Glucose Agar
	Ossidasi

Per la composizione dei terreni si rimanda alle ISO indicate

**Tutti i terreni e reagenti citati sono disponibili in forma commerciale e l'utilizzo si intende a formula completa
Nella scelta dei prodotti commerciali verificare che le composizioni corrispondano a quelle indicate nelle corrispondenti ISO**

LE IMMAGINI PRESENTI SONO ORIGINALI E DI PROPRIETA' DELL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Si ringraziano i fotografi:

Bruno Ballatore, Luigi Santucci e Antonio Sesta

(Settore Attività Editoriali dell'ISS per le riprese fotografiche)

APPENDICE



Malattie di origine alimentare da agenti biologici

Definizioni:

INTOSSICAZIONE

INGESTIONE DI TOSSINA PREFORMATA

→ *CL. BOTULINUM*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

TOSSINFEZIONE

INGESTIONE DI TOSSINE PREFORMATE E DI BATTERI VIVI

→ *BACILLUS CEREUS*, *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*, *SALMONELLA*

INFEZIONE

INGESTIONE DI MICROORGANISMI VIVI

→ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

FATTORI EPIDEMIOLOGICI PREDISponentI

- FASCE ESTREME DI ETÀ
- SCARSA IGIENE
- SOVRAFFOLLAMENTO (FOCOLAI SPESSO IN COMUNITÀ CHIUSE)
- ABITUDINI ALIMENTARI (CIBI CRUDI O POCO COTTI : BINOMIO TIPICO PRODOTTI DELLA PESCA – VIBRIONI O INSACCATI CRUDI – SALMONELLE)
- CLIMA (MESI PIÙ CALDI)
- NUMERO DI GERMI NELL'ALIMENTO

TEMPI D' INSORGENZA DEI SINTOMI NELLE PRINCIPALI MALATTIE VEICOLATE DA ALIMENTI

TRATTO GASTRO- INTESTINALE SUPERIORE NAUSEA, VOMITO	2 - 4 h	<i>Staphylococcus aureus</i>
	8 - 16 h	<i>Bacillus cereus</i>
	6 - 24 h	Funghi (<i>Amanita</i>)
BOCCA SECCA E SINTOMI RESPIRATORI	12 - 72 h	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	2 - 5 gg	<i>Corynebacterium diptheriae</i>

TEMPI D’ INSORGENZA DEI SINTOMI NELLE PRINCIPALI MALATTIE VEICOLATE DA ALIMENTI

TRATTO GASTROINTESTINALE INFERIORE CRAMPI, DIARREA	6 - 12 h	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i>
	18 – 36 h	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Campylobacter</i>
	3 – 5 gg	Virus enterici
SINTOMI NEUROLOGICI VISTA, VERTIGINI, FORMICOLIO, PARALISI	➤1 h	Tossine da molluschi, funghi (<i>Muscaria</i>), tossina da tetrodottidi
	1 – 6 h	Tossina ciguatera
	12 – 36 h	<i>Clostridium botulinum</i>

TEMPI D' INSORGENZA DEI SINTOMI NELLE PRINCIPALI MALATTIE VEICOLATE DA ALIMENTI

<p>SINTOMI DA INFEZIONE GENERALIZZATA</p> <p>FEBBRE, BRIVIDI, MALESSERE, PROSTRAZIONE, DOLORI, INGROSSAMENTO LINFONODI</p>	<p>9 gg 10 - 13 gg 14 gg</p> <p>Tempi variabili</p>	<p><i>Trichinella spiralis</i> <i>Toxoplasma gondii</i> <i>Salmonella typhi</i></p> <p><i>Bacillus anthracis</i>, <i>Brucella</i>, <i>Francisella</i>, <i>Listeria</i>, <i>Pasteurella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Mycobacterium</i>, <i>Leptospira</i></p>
<p>SINTOMI GASTROINTESTINALI O NEUROLOGICI (TOSSINE DA MOLLUSCHI)</p>	<p>Da 30 minuti a 4 h</p>	<p>Saxitossina (PSP) Brevitossina (NSP) Acido okadaico, pectenotossina, yessotossina (DSP), Acido domoico (ASP)</p>

- **REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007 DELLA COMMISSIONE del 5 dicembre 2007**
- **che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari**

- **CRITERI DI IGIENE DEL PROCESSO**

- **Frutta e ortaggi pretagliati.** (pronti al consumo, analizzati durante il processo di lavorazione ai fini del miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime)

- Ricerca: *E. coli*

- Numero di unità che costituiscono il campione (n) : 5

- Limiti di accettabilità: **100 ufc/g** (valore m) e **1 000 ufc/g** (valore M) in 2 unità campionarie (valore c)

- Metodo d'analisi di riferimento: ISO 16649-1 o 2

- **Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati** (pronti al consumo, analizzati durante il processo di lavorazione ai fini del miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime)

- Ricerca: *E. coli*

- Numero di unità che costituiscono il campione (n) : 5

- Limiti di accettabilità: **100 ufc/g** (valore m) e **1 000 ufc/g** (valore M) in 2 unità campionarie (valore c)

- Metodo d'analisi di riferimento: ISO 16649-1 o 2

- n = numero di unità che costituiscono il campione; c= numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m e M

- — soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

- — accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

- — insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M

- **REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007 DELLA COMMISSIONE del 5 dicembre 2007**
- **che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari**
- **CRITERI DI SICUREZZA**
- **Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali**
- **Ricerca: *Listeria monocytogenes***
- Numero di unità che costituiscono il campione (n) : 5
- - Limite di accettabilità per prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità: **100 ufc/g**
- Metodo d'analisi di riferimento: EN/ISO 11290-2
- - Limite di accettabilità prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce: **assente in 25 g**
- Metodo d'analisi di riferimento: EN/ISO 11290-1.
- **Semi germogliati (pronti al consumo, immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità)**
- **Ricerca: *Salmonella***
- Numero di unità che costituiscono il campione (n) : 5
- Limite di accettabilità: **assente in 25 g**
- Metodo d'analisi di riferimento: EN/ISO 6579
- **Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo, immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità)**
- **Ricerca: *Salmonella***
- Numero di unità che costituiscono il campione (n) : 5
- Limite massimo di accettabilità: **assente in 25 g**
- Metodo d'analisi di riferimento: EN/ISO 6579
- **Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo, immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità)**
- **Ricerca: *Salmonella***
- Numero di unità che costituiscono il campione (n) : 5
- Limite massimo di accettabilità: **assente in 25 g**
- Metodo d'analisi di riferimento: EN/ISO 6579



Finito di stampare da

Tipografia Camuna S.p.A. - Breno (Bs)

Centro Stampa di Brescia

nel mese di marzo 2014

Informazione ecologica:

pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcoliche

Sistema Cesium® brevetto **Philip Borman Italia**

ISBN 978-88-97562-10-8



9 788897 562108