

## Scheda di sintesi – Vincenzo Valentino

Gli Operatori del Settore Alimentare (OSA) effettuano detersione e disinfezione di routine nelle loro aziende come parte delle strategie atte a garantire qualità e sicurezza degli alimenti. L'obiettivo di queste procedure è rimuovere i residui di alimenti e limitare l'aderenza di microbi sulle superfici, sugli strumenti e sui macchinari. Tuttavia, diversi microrganismi persistono sulle superfici a contatto con gli alimenti anche dopo l'applicazione delle procedure di sanificazione. Alcuni di questi microbi sono transienti, mentre altri diventano residenti, adattandosi specificamente alle condizioni presenti nello stabilimento. Una delle strategie che i microrganismi adottano per diventare residenti è la produzione di biofilm.

Tra i microrganismi più comunemente isolati da superfici a contatto con gli alimenti al termine della sanificazione figurano *Acinetobacter johnsonii*, nonché diverse specie appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (1). I membri del genere *Pseudomonas* sono in grado di formare biofilm maturi anche a temperature basse (2), i quali possono potenzialmente includere e offrire protezione anche ad agenti patogeni di origine alimentare (3). D'altro canto, specie come *A. johnsonii* sono naturalmente dotate di geni che conferiscono resistenza ad antibiotici come i beta-lattamici (4), i quali possono essere trasferiti anche a specie commensali. In effetti, recenti studi dimostrano che l'esposizione a basse concentrazioni di disinfettanti (inclusi quelli utilizzati nell'industria alimentare) possa favorire la trasmissione di geni legati all'antibiotico resistenza (5).

Tuttavia, la presenza di microrganismi selezionati in uno specifico ambiente di produzione può conferire caratteristiche uniche al prodotto finito, come avviene nei caseifici (6).

Ad oggi non vi sono limiti di legge in termini di contaminazione microbica residuale successiva alle procedure di pulizia e disinfezione (anche se con alcune eccezioni), e gli operatori del settore alimentare verificano l'efficacia di dette procedure attraverso piani di monitoraggio basati sui principi dell'HACCP che prevedono l'isolamento dei microrganismi e sulla loro caratterizzazione fenotipica, nonché sul conteggio della carica microbica totale (metodi coltura-dipendenti). Questi metodi, però, hanno alcuni limiti. I metodi coltura-dipendenti sono infatti lenti, dal momento che per l'identificazione e la caratterizzazione metabolica di un isolato può essere necessaria più di una settimana. Inoltre, con le metodologie coltura-dipendenti si possono riscontrare falsi negativi, poiché i microrganismi vitali ma non coltivabili non sono in grado di crescere in piastra, pur essendo metabolicamente attivi. Infine, detti metodi sono incapaci di isolare le specie definite come 'non coltivabili', per le quali non sono ancora stati messi a punto terreni di coltura ad-hoc o con una lenta crescita.

Pertanto, è indispensabile sviluppare nuove procedure finalizzate a verificare l'efficacia di detersione e disinfezione e a descrivere nel dettaglio le comunità che risiedono nelle industrie alimentari. Tali procedure potrebbero evidenziare punti deboli nelle procedure di sanificazione, così da aiutare gli operatori del settore alimentare a effettuare scelte mirate e a prevenire gli sprechi alimentari, rendendo l'industria alimentare più sostenibile. Oppure, al contrario, le suddette procedure potrebbero aiutare gli OSA a caratterizzare velocemente i microrganismi presenti nell'impianto di produzione, mettendone in evidenza potenziali funzioni protecnologiche.

A tal proposito, la metagenomica, cioè il sequenziamento ad alto rendimento degli acidi nucleici estratti da intere comunità microbiche, rappresenta una rivoluzione. Infatti, questo approccio ha permesso la scoperta di microrganismi precedentemente mai caratterizzati, fornendo anche nuove informazioni sul loro potenziale metabolico. Inoltre, grazie al continuo progresso tecnologico, i tempi di queste analisi sono notevolmente inferiori rispetto a quelli richiesti dalle tecniche coltura-dipendenti.

Pertanto, l'obiettivo di questa tesi è stato validare una procedura basata sul sequenziamento del DNA microbico raccolto nelle industrie alimentari con l'obiettivo di analizzare la struttura delle comunità (a livello di specie e di ceppo) e le loro potenziali implicazioni sulla qualità e sicurezza degli alimenti. Questa procedura potrebbe rappresentare un nuovo strumento per gli operatori del settore alimentare per verificare con maggiore rapidità e accuratezza l'efficacia delle loro procedure di detersione e disinfezione.

Per raggiungere quest'obiettivo, ho applicato la procedura in diverse aziende alimentari, raccogliendo campioni ambientali, ingredienti e prodotti finiti. Successivamente, è stato estratto e sequenziato il DNA microbico da ciascun campione, e mediante l'ausilio di strumenti informatici, mi sono occupato dell'analisi delle specie presenti e del loro potenziale funzionale. I **Capitoli 3 e 4** discutono rispettivamente i risultati ottenuti dopo l'applicazione delle tecnologie di sequenziamento ad alto rendimento in aziende che producono vegetali minimamente processati e gelati, focalizzando l'attenzione sulla presenza di patogeni e di geni associati a virulenza e antibiotico-resistenza. Il **Capitolo 5** si concentra sui microrganismi stabilizzatisi in caseifici appartenenti a 4 Stati europei (Italia, Spagna, Irlanda e Austria). In questo capitolo sono stati discussi i potenziali benefici di questi microbi, con un focus sulla produzione di batteriocine e sulla diversità a livello di ceppo specifica di ciascun'azienda. In aggiunta, il **Capitolo 6** riporta i risultati ottenuti dall'analisi metagenomica su larga scala dell'ambiente di produzione di diversi tipi di industrie alimentari, concentrandosi sull'antibiotico-resistenza e sulla sua potenziale trasmissibilità.

Infine, il capitolo delle **Conclusioni** discute le prospettive future e la fattibilità dell'applicazione di queste procedure per il monitoraggio della contaminazione delle superfici dopo la detersione e la disinfezione.

## Bibliografia

1. Møretør T, Langsrud S. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017 Sep;16(5):1022–41.
2. Maifreni M, Di Bonaventura G, Marino M, Guarnieri S, Frigo F, Pompilio A. Biofilm formation under food-relevant conditions and sanitizers' tolerance of a *Pseudomonas fluorescens* group strain. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2023 Jun 1;134(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jambio/lxad117>
3. Galié S, García-Gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 May 7;9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
4. Castillo-Ramírez S, Mateo-Estrada V, Gonzalez-Rocha G, Opazo-Capurro A. Phylogeographical analyses and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter johnsonii* highlight its clinical relevance. *mSphere* [Internet]. 2020 Aug 26;5(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00581-20>
5. Li L, Short FL, Hassan KA, Naidu V, Pokhrel A, Nagy SS, et al. Systematic analyses identify modes of action of ten clinically relevant biocides and antibiotic antagonism in *Acinetobacter baumannii*. *Nat Microbiol* [Internet]. 2023 Oct 9; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-023-01474-z>

6. Bokulich NA, Mills DA. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Sep;79(17):5214–23.