

BATTERIOCINE: EVOLUZIONE, ECOLOGIA ED APPLICAZIONI PRATICHE

BACTERIOCINS: EVOLUTION, ECOLOGY AND PRACTICE APPLICATION

Valeria Raffi, Maria Cristina Ossiprandi

PAROLE CHIAVE:

batteriocina, proteina, attività antimicrobica, bioconservante, probiotico.

KEY WORDS:

bacteriocin, protein, antimicrobial activity, bio-preservative, probiotic.

Riassunto

I microrganismi, per loro stessa natura, sono in grado di attivare una serie di sistemi difensivi estremamente varia.

Tra questi sistemi rientrano i classici antibiotici, svariati agenti litici, diversi prodotti del metabolismo batterico, varie tipologie di esotossine, e le batteriocine.

Lo scopo di questo articolo è quello di fornire un quadro sufficientemente ampio e dettagliato per quanto concerne uno dei sistemi difensivi più consistenti e diversificati del mondo batterico: le batteriocine.

Verranno affrontate le caratteristiche generali di queste straordinarie proteine con un'attenzione particolare alle batteriocine prodotte da batteri lattici analizzandone, nel dettaglio, la genetica e la regolazione della loro produzione, il meccanismo d'azione ed il ruolo ecologico che queste sostanze svolgono all'interno di una popolazione batterica.

In seguito l'attenzione verrà focalizzata sul ruolo svolto dalle batteriocine in campo clinico e sulla salute umana, delineando un loro possibile e proficuo utilizzo in qualità di bioconservanti alimentari.

Verranno inoltre riportati i dati sperimentali relativi all'attività della colicina V+, batteriocina prodotta da *E. coli*, con la finalità di stimarne la sua azione specifica nei confronti di diversi stiptiti batterici sia Gram positivi che Gram negativi.

Abstract

Microbes produce an extraordinary array of microbial defence systems.

Sezione di Microbiologia ed Immunologia Veterinaria Dipartimento Salute Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Parma
Via del Taglio n° 8 - 43100 Parma - Tel. 0521/032718
mariaacristina.ossiprandi@unipr.it

These include classical antibiotics, lytic agents, metabolic by-products, several different types of protein exotoxins, and bacteriocins.

The purpose of this article is to review current knowledge about one of the most abundant and diverse family of microbial defence systems: the bacteriocins.

First of all, we discuss the general characteristics of these extraordinary proteins, in particular bacteriocins produced by lactic acid bacteria, the genetics and regulation of their production, their mode of action and ecological role (mediating bacterial population-level and controlling community-level dynamics).

In the latter half of this article we focus on the potential possible role played by bacteriocins in biomedical and human health field, with particular reference to the current role in food preservation.

It's also reported results concerning activity of colicin V+, bacteriocin produced by *Escherichia coli*, to estimate its specific action against various Gram positive and negative strains.

Introduzione

Col termine “batteriocine”, coniato nel 1953 da Jacob e collaboratori, vengono indicate quelle molecole proteiche di produzione batterica generate indifferentemente da Gram-positivi e da Gram-negativi e dotate di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, ma a questo strettamente correlati.

La famiglia delle batteriocine comprende un'ampia gamma di proteine che si differenziano in termini di dimensioni, struttura chimica, cellule *target*, modalità d'azione e meccanismi immunitari indotti, e che si ritiene vengano prodotte dal 99% delle specie batteriche presenti in natura.

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi sono generalmente proteine ad elevato peso molecolare che presentano un caratteristico dominio, specifico per l'adesione, la traslocazione o l'attività di *killing* della batteriocina stessa, mentre le batteriocine prodotte dai batteri Gram positivi sono generalmente peptidi cationici, di piccole dimensioni e termostabili, inizialmente sintetizzati come pre-peptidi e che, in seguito a fenomeni di scissione, si trasformano nelle molecole biologicamente attive.

Genetica

L'informazione genetica che codifica per la produzione di batteriocine può essere contenuta sia a livello plasmidico, sia a livello cromosomico e tale produzione può avvenire spontaneamente oppure conseguire ad una stimolazione operata da agenti ambientali, fisici o chimici.

I geni che codificano per le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi risultano localizzati a livello plasmidico, mentre i geni che codificano per le batteriocine prodotte dai Gram positivi possono essere presenti sia a livello plasmidico che cromosomico, ed inoltre si localizzano specificamente in strutture multigene operone-simili; il corredo genetico deputato alla produzione delle batteriocine ad opera dei Gram positivi risulta anche estremamente più ampio rispetto a quello dei Gram negativi.

Meccanismo d'azione

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi si differenziano rispetto a quelle elaborate da microrganismi Gram positivi in quanto le prime agiscono mediante formazione di canali ionici a livello di membrana citoplasmatica e mostrano, una volta penetrate nella cellula sensibile/*target*, una spiccata attività nucleasica, mentre le seconde sono “membrana-attive”, ossia operano direttamente a livello di membrana (1).

Le batteriocine prodotte dai batteri Gram negativi aderiscono alle cellule bersaglio grazie alla presenza di specifiche unità recettoriali presenti a livello di membrana esterna delle cellule sensibili coinvolte. Quelle prodotte dai microrganismi Gram positivi non mostrano invece alcun assorbimento specifico, pur non potendosi escludere a priori la possibilità di una via di assorbimento preferenziale per quelle specifiche batteriocine caratterizzate da uno spettro d'azione più limitato (2).

Lo spettro d'inibizione delle batteriocine prodotte dai Gram negativi è strettamente correlato alla specie produttrice, mentre le batteriocine prodotte dai Gram positivi si dimostrano attive non solo verso altri batteri Gram positivi ma, occasionalmente, anche verso microrganismi Gram negativi.

Risulta poi di un certo interesse la constatazione che il *range* di sensibilità può incrementare, anche notevolmente, al variare del pH, così come in presenza di particolari sostanze chimiche che agiscono alterando l'integrità della parete batterica.

Regolazione della produzione delle batteriocine

Per quanto concerne la regolazione della produzione di batteriocine, i microrganismi Gram positivi elaborano uno specifico e personale sistema di regolazione, mentre i batteri Gram negativi si basano su diversi sistemi regolatori.

In entrambi i casi risulta di particolare rilevanza un sistema di regolazione batterica denominato *quorum sensing system*; tale sistema risulta essere influenzato dalla densità cellulare presente nel substrato (3, 4, 5).

Esistono nel mondo procariotico alcuni sistemi di controllo globale che consentono ad un microrganismo di rispondere in modo estremamente efficace ai segnali offerti dall'ambiente.

Un interessante “segnale” è, per l'appunto, quello riportabile alla presenza di altri organismi appartenenti alla stessa specie. Alcune specie batteriche, infatti, possiedono sistemi regolatori che si basano sulla percezione della densità batterica di cellule appartenenti alla stessa specie nell'ambito della popolazione. È questa forma di controllo che viene appunto definita *quorum sensing*. Si stabilisce, in altri termini, una sorta di *network* di comunicazione tra cellula e cellula, basata su fattori solubili (N-acil-L-omoserina per i batteri Gram negativi e varie unità peptidiche per batteri Gram positivi) che spesso determinano la formazione di biofilm microbici. Questo mezzo di comunicazione intercellulare viene innescato per regolare la trascrizione genica di strutture coinvolte in differenti processi fisiologici come la bioluminescenza, il trasferimento di materiale plasmidico per via coniugativa e la produzione di specifici fattori di virulenza. Svariate specie microbiche impiegano questa strategia di comunicazione per mantenere una crescita organizzata nell'ambiente, situazione

indispensabile per la sopravvivenza di taluni patogeni nell'ospite. Ciascun batterio Gram negativo che possieda questo sistema di controllo, risulta dotato di un enzima che sintetizza omoserina lattone acilato (AHL), molecola che diffonde all'esterno della cellula. All'interno della cellula l'AHL si concentra in modo specifico soltanto nel momento in cui ve ne siano numerose altre nelle vicinanze produttrici della stessa molecola. Queste molecole "segnale" a basso peso molecolare possono venire considerate come induttori che attivano la trascrizione genica da parte del cromosoma, producendo opportuni fattori di virulenza batteriocine incluse.

Batteriocine prodotte dai batteri lattici

Tra le specie batteriche presenti in natura, in particolare i batteri lattici (LAB: *lactic acid bacteria*) hanno sviluppato la capacità di produrre un'ampia gamma di batteriocine.

Le batteriocine prodotte dai LAB sono state suddivise da Kleanhammer (6) in tre classi, a cui se ne aggiunge una quarta attualmente poco nota (7):

- **Batteriocine di classe I:** definite lantibiotici. Si tratta di molecole a basso peso molecolare, termostabili e modificate post-traduzionalmente; la nisina rappresenta il classico prototipo delle batteriocine appartenenti a questa classe (8).
- **Batteriocine di classe II:** molecole di piccole dimensioni, idrofobiche e relativamente termostabili. Questa classe viene, a sua volta, suddivisa in 3 sotto-gruppi: la classe IIa (9), il gruppo più ampio e più importante per la sua attività anti-*Listeria*, la classe IIb, batteriocine formate da due peptidi, e la classe IIc, che comprende batteriocine inquadrate come *sec-dependent*, sulla base del loro intrinseco meccanismo di secrezione (10).
- **Batteriocine di classe III:** proteine di notevoli dimensioni e termolabili.
- **Batteriocine di classe IV:** molecole complesse nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica.

Ruolo ecologico delle batteriocine

Le batteriocine svolgono una funzione chiave in termini "relazionali" all'interno delle diverse comunità batteriche, anche se il ruolo di queste sostanze antimicrobiche non è stato ancora definitivamente chiarito.

La sintesi batteriocinica, talvolta estremamente elevata sotto l'aspetto quantitativo, potrebbe suggerire un possibile coinvolgimento di tali sostanze sia nei meccanismi difensivi (impedisce l'invasione ad opera di altri ceppi o specie batteriche all'interno dell'*habitat* del batterio produttore), che offensivi, mettendo in atto strategie invasive con conseguente stanziamento in una particolare nicchia ecologica (4).

Applicazioni delle batteriocine in campo clinico ed alimentare

Queste sostanze a spiccata attività antimicrobica hanno riscosso un crescente interesse soprattutto per il loro possibile impiego sia in campo clinico che in quello

tecnologico/alimentare (in particolar modo le batteriocine prodotte dai batteri lattici e definite per l'appunto lantibiotici).

Per quanto attiene alle applicazioni in campo clinico, le batteriocine rappresentano una valida soluzione alternativa agli antibiotici. Infatti, grazie al loro limitato spettro d'azione, possono essere considerate “farmaci d'elezione” che agiscono specificatamente su determinati agenti patogeni; ciò consentirebbe, per lo meno in linea teorica, una drastica diminuzione dell'utilizzo degli antibiotici, riducendo in tal modo da un lato lo sviluppo di antibiotico-resistenza da parte dei ceppi patogeni e dall'altro il depauperamento della flora apatogena commensale presente nell'organismo.

Ne sia d'esempio la latticina 3147, batteriocina prodotta da *Lactococcus lactis*, che ha mostrato una spiccata attività nei confronti dei principali agenti mastitogeni Gram positivi (11, 12, 13, 14, 15). Appare quindi evidente come la latticina 3147 presenti interessanti potenzialità di utilizzo sia in fase di trattamento terapeutico che in fase di prevenzione e controllo della mastite bovina.

In campo alimentare le batteriocine possono essere utilizzate come bio-conservanti per controllare e contenere la popolazione batterica indesiderata e responsabile di intossicazioni e deterioramento della matrice alimentare.

Allo stato attuale delle cose, tuttavia, le sole batteriocine utilizzate in campo alimentare sono quelle prodotte dai batteri lattici.

In particolare la prima batteriocina, approvata nel 1988 dall'FDA (*Food and Drug Administration*) in qualità di bio-conservante, è stata la nisina, sostanza antimicrobica prodotta da *Lactococcus lactis* e appartenente alla classe dei cosiddetti lantibiotici.

Attualmente la nisina viene impiegata come bio-conservante alimentare in oltre 45 Paesi, e rimane la sola batteriocina che può essere aggiunta ai prodotti alimentari (16).

Questo bio-conservante ha trovato larga applicazione nei prodotti di origine lattiero-casearia, nelle carni, nei prodotti vegetali (frutta compresa), nei prodotti di panetteria e pescheria, così come in talune tipologie di bevande (8, 14, 17).

Oltre che per prevenire la contaminazione da parte di batteri patogeni nei prodotti alimentari, le batteriocine possono essere impiegate anche per migliorare le caratteristiche qualitative intrinseche del prodotto stesso (18).

Come diretta conseguenza di quanto finora sottolineato, l'utilizzo delle batteriocine potrebbe costituire uno strumento “tecnologicamente” corretto ed efficace, impiegabile nella produzione di quei prodotti definiti “di alta qualità” che si conservano per lunghi periodi di tempo in assenza di alterazioni ed in totale sicurezza mantenendo le caratteristiche organolettiche intrinseche.

Anche in questo settore si è dimostrata utile la nisina, in grado di agire inibendo la produzione di spore da parte dei batteri dei generi *Bacillus* e *Clostridium* e nell'ambito della produzione di differenti prodotti lattiero-caseari precedentemente sottoposti a processo di pastorizzazione (19, 20, 21).

La nisina, inoltre, si è dimostrata attiva ed efficace nei confronti di una vasta gamma di batteri Gram positivi, compresa *Listeria monocytogenes*, agente eziologico di una delle intossicazioni alimentari più frequenti e pericolose in termini sanitari, la listeriosi (22, 23).

Per completare il quadro relativo alle possibilità applicative di queste sostanze antimicrobiche, va ricordato l'utilizzo di colture batteriche produttrici di batteriocine in qualità di probiotici alimentari.

Col termine di probiotico si intende, in modo estremamente schematico, una preparazione a base di particolari microrganismi: anche in questo caso i batteri lattici sono quelli più ampiamente utilizzati a tale scopo infatti, una volta somministrati, migliorano le proprietà della microflora autoctona dell'organismo ricevente.

L'incorporazione dei microrganismi probiotici può essere estesa ai prodotti lattiero-caseari, alle formulazioni per l'infanzia, ai succhi di frutta, ai prodotti a base di cereali ed a taluni prodotti farmaceutici (24, 25).

È stata inoltre evidenziata la capacità per alcune specie batteriche, nello specifico *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, di inibire la crescita di *Helicobacter pylori*, uno dei principali agenti eziologici responsabili di ulcere gastro-duodenali, grazie alla liberazione di molecole proteiche riconducibili a specifiche batteriocine. La somministrazione in forma probiotica di queste specie batteriche ed in soggetti geneticamente predisposti previene, in primo luogo, la formazione di ulcere a livello gastroenterico e, secondariamente, ha esitato in un diretto coinvolgimento nella stabilizzazione della barriera gastrica oltre che nella riduzione dell'infiammazione mucosale.

Dati sperimentali hanno rivelato come l'utilizzo di probiotici non porti all'eradicazione definitiva e completa di *H. pylori*, ma sia in grado di contenere il livello gastrico del patogeno, inibendo in tal modo la sintomatologia clinica (26, 27, 28).

Materiali e metodi

Sono stati impiegati stipiti di *Salmonella enterica* e di *Yersinia enterocolitica* ricavati nel corso di una precedente indagine effettuata su campioni carnei destinati all'alimentazione del cane, nonché ceppi appartenenti ad altri generi, sempre isolati presso la Sezione di Microbiologia ed Immunologia del Dipartimento di Salute Animale, e riportabili a *Pasteurella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp. (29, 30).

Test per la produzione di colicine

Consente di saggiare l'attività batteriocinica posseduta dal ceppo di *Escherichia coli* colicina V+ (ATCC 14763), allo scopo di evidenziarne la capacità di elaborare batteriocine (colicine) attive nei confronti di altri ceppi appartenenti alla stessa specie e nei confronti di stipiti appartenenti a generi differenti.

Ceppo produttore: *Escherichia coli* colicina V+ (ATCC 14763)

Ceppi testati: 42 ceppi di *Yersinia enterocolitica* (uno dei quali di referenza: CIP 6529), 24 stipiti di *Salmonella enterica* (di cui 2 di referenza per *Salmonella pullorum* e *Salmonella typhi*), 4 ceppi di *Pasteurella* spp., 3 ceppi di *Aeromonas hydrophila*, un singolo ceppo riportabile a *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Alcaligenes* spp.

Metodica: tutti i ceppi, compreso il ceppo indicatore, sono stati seminati

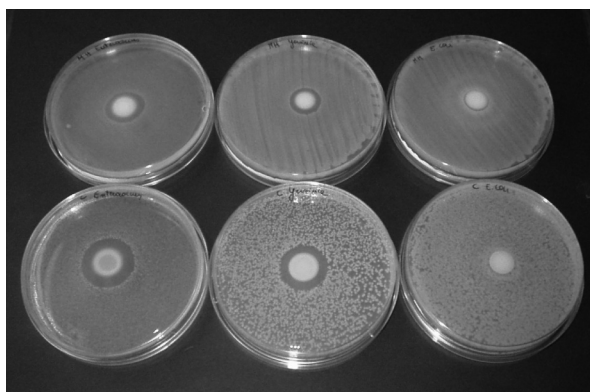
in *Tryptose broth* addizionato di estratto di lievito 0.3% e di CaCl_2 0,145%. Dopo incubazione a 37°C per 8-10 ore, sono state eseguite diluizioni del ceppo colicinico provvedendone alla semina di una aliquota pari a 0.5 ml sullo stesso terreno agarizzato. Si è proceduto quindi ad eliminare l'eventuale liquido in eccesso presente sulla superficie della piastra, lasciando la stessa ad asciugare sotto cappa sterile a flusso laminare per un periodo di almeno 20 minuti.

In seguito, la brodocoltura del ceppo da testare, in volume di 10 µl, è stata deposta al centro delle piastre, che sono state poi incubate per 16-18 ore ad una temperatura di 30°C.

La produzione di colicine si evidenzia attraverso la formazione di un alone di inibizione misurabile attorno al ceppo in esame (31, 32).

Figura 1:

immagine relativa agli aloni di inibizione riguardanti alcune delle specie batteriche prese in esame.



Risultati

I risultati relativi alla parte sperimentale vengono riportati in tabella 1.

Tabella 1:

risultati concernenti la sensibilità dei ceppi saggiati nei confronti della colicina V+.

Nella prima colonna vengono indicati i ceppi saggiati, mentre nella seconda vengono riportati i relativi diametri di inibizione evidenziati durante la prova.

CEPPO	+/-	CEPPO	+/-
<i>S. enterica tennessee 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica CIP 6529</i>	-
<i>S. enterica blockley 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 763</i>	-
<i>S. enterica enteritidis 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 153</i>	+ (>5mm)
<i>S. enterica dublin</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 89</i>	+ (>4mm)
<i>S. enterica tennessee 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 21B</i>	+ (>4mm)
<i>S. enterica java</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 47</i>	-

CEPPO	+/-	CEPPO	+/-
<i>S. enterica derby 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 25sd</i>	+ (>4mm)
<i>S. enterica derby 4</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 85</i>	+ (>3mm)
<i>S. enterica pullorum</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 387</i>	+ (>5mm)
<i>S. enterica st. paul 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 11C</i>	-
<i>S. enterica enteritidis 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 314</i>	-
<i>S. enterica typhi ref.</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 512</i>	-
<i>S. enterica anatum 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 48</i>	-
<i>S. enterica coeln C1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 3A</i>	-
<i>S. enterica blockley 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 84</i>	-
<i>S. enterica thompson</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 42</i>	-
<i>S. enterica derby 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 391</i>	-
<i>S. enterica derby 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 772</i>	-
<i>S. enterica enteritidis 3</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 31</i>	-
<i>S. enterica anatum 1</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 14</i>	-
<i>S. enterica typhimurium</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 18</i>	-
<i>S. enterica anatum 2</i>	+ (>4mm)	<i>Yersinia enterocolitica 32sd</i>	-
<i>S. enterica tennessee 2</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 384</i>	-
<i>S. enterica infantis</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 911</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 293sd</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 97</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 46</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica 1032sd</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 183</i>	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 99</i>	-	<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 74</i>	-	<i>Streptococcus spp.</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 771</i>	-	<i>Staphylococcus spp.</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	<i>Pasteurella spp. A</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 192sd</i>	-	<i>Pasteurella spp. B</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 71sd</i>	-	<i>Pasteurella spp. C</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 88</i>	-	<i>Pasteurella spp. D</i>	+ (<2mm)
<i>Yersinia enterocolitica 365</i>	-	<i>Alcaligenes faecalis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 654sd</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 34A</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila A</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 643sd</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila B</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica 504sd</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila C</i>	-

Discussione e conclusioni

Innanzitutto è possibile affermare che per *Yersinia*, si è evidenziata sensibilità per 6 dei 41 stipti saggiati (14.6% con intervallo di confidenza al 95% compreso tra i seguenti valori: 0,001 e 0,228) escludendo il ceppo di referenza; mentre per *Salmonella* si è riscontrato 1 ceppo sensibile su 22 (4.5% con intervallo di confidenza, al 95%, tra i valori 0,056 e 0,292).

Il raffronto statistico ottenuto dai dati relativi ai suddetti due generi non evidenzia significatività di relazione tra i parametri Genere, nella fattispecie *Salmonella* e *Yersinia*, e Sensibilità alle specifica batteriocina in oggetto.

Tutti e quattro gli stipti di *Pasteurella* spp. hanno presentato sensibilità nei confronti della colicina prodotta dal ceppo di *Escherichia coli* V+, mentre, ad eccezione dello stipte di *Staphylococcus* spp. anch'esso risultato sensibile, tutte le altre specie non hanno esibito alcun alone di inibizione.

I dati riferibili a queste diverse specie batteriche, essendo stati estrapolati e ricavati da casi singoli o limitati a pochi ceppi, consentono soltanto alcune semplici considerazioni che hanno valore indicativo, costituendo un dato preliminare che necessiterebbe di ulteriori conferme e approfondimenti.

Sulla base delle considerazioni fino ad ora apportate, è possibile concludere che le batteriocine sono dotate di un elevato potenziale applicativo. Risulta, pertanto, fondamentale e necessario continuare ad approfondire le ricerche per comprendere sempre più a fondo le caratteristiche intrinseche di queste molecole, ampliando, se possibile, il loro coinvolgimento in ambito sia bio-medico che alimentare.

Ringraziamenti

Si ringrazia la sig.ra Cinzia Reverberi ed il sig. Roberto Lurisi per l'assistenza tecnica prestata.

Bibliografia

1. Bruno M.E.C., Montville T.J. (1993) Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 59(9): 3003-3010.
2. Yang R., Johnson M.C., Ray B. (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 58: 3355-3359.
3. Fuqua C., Parsek M.R., Greenberg E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 35: 439-68.
4. Miller M.B., Bassler B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55: 165-99.
5. Lerat E., Moran N.A. (2004) The evolutionary history of quorum-sensing-systems in bacteria. *Mol Biol Evol*, 21(5): 903-913.
6. Kleanhammer T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimic*,

- 70: 337-49.
7. Cotter P., Hill C., Ross R.P. (2006) What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.* doi: 10.1038/nrmicro1273-c1.
 8. Twomey D., Ross R.P., Ryan M., Meaney B., Hill C. (2002) Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
 9. Kaur K., Andrew L.C., Wishart D.S., Vederas J.C. (2004) Dynamic relationship among type IIa bacteriocins: temperature effects on antimicrobial activity and on structure of the C-terminal amphipathic alpha elix as a receptor-binding region. *Biochemistry* 43: 9009-20.
 10. Holo H., Nes I.F. (2000) Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers*, 55: 50-61.
 11. Crispie F., Flynn J., Ross R., Hill C., Meaney W. (2004) Update on the development of a novel dry cow therapy using a bismuth-based intramammary teat seal in combination with the bacteriocin lactocin 3147. *Irish-Veterinary-Journal*, 57(11): 652-656.
 12. Galvin M., Hill C., Ross R.P. (1999) Lactocin 3147 displays activity in buffer against Gram-positive pathogens which appear insensitive in standard plate assays. *Lett Appl Microbiol*, 28: 255-258.
 13. Mc Auliffe O., Ryan M.P., Ross R.P., Hill C., Breeuwer P., Abee T. (1998) Lactocin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. *Appl Environ Microbiol*, 64: 439-445.
 14. Ross R.P., Galvin M., Mc Auliffe O., Morgan S.M., Ryan M.P., Twomey D.P., Meaney W.J., Hill C (1999) Developing application for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 337-346.
 15. Ryan M.P., Meaney W.J., Ross R.P., Hill C. (1998) Evaluation of lactocin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol*, 64: 2287-2290.
 16. Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J., Hugenholtz J. (1996) Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69: 193-202.
 17. Luchansky J.B. (1999) Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 335.
 18. Morgan S., Ross R.P., Hill C. (1995) Bacteriolytic activity caused by the presence of a novel lactococcal plasmid encoding lactococcin A, B and M. *Appl Environ Microbiol*, 61: 2995-3001.
 19. Cortezzo D.E., Setlow B., Setlow P. (2004) Analysis of the action of compounds that inhibit the germination of spores of *Bacillus* species. *J. of Appl. Microbiol.* 96(4): 725-741.
 20. Lopez-Pedemonte T.J., Roig-Sagues A.X., Trujillo A.J., Capellas M., Guamis B. (2003) Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *J. Dairy Sci.* 86: 3075-3081.
 21. Hakovirta J., Reunanen J., Saris P.E.J. (2006) Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products.

- Appl. Envir. Microbiol. 72: 1001-1005.
22. Martinez B., Rodriguez A. (2005) Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. FEMS-Microbiology-Letters, 252(1): 67-72.
 23. Schillinger U., Becker B. Vignolo G., Holzapfel W.H. (2001) Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. Intern J Food Microbiol, 71: 159-168.
 24. Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1996) Clinical uses of probiotics for stabilising the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie van Leeuwenhoek 70: 251-262.
 25. Soomro A.H., Masud T., Anwaar K. (2002) Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. Pakistan Journal of Nutrition, 1: 20-24.
 26. Gotteland M., Brunser O., Cruchet S. (2006) Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? Aliment Pharmacol Ther, 23(8): 1077-1086.
 27. Ghosh S., Van Heel D., Playford R.J. (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? Gut, 53: 620-622.
 28. Le Duc H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. App and Envir Microbiol 70(4): 2161-2171.
 29. Brindani F., Ossiprandi M.C., Paterlini F., Perini S. (1995) Attività batteriocinica in stipiti di *Pasteurella*. Obiettivi e Documenti Veterinari 5: 45-47.
 30. Ossiprandi M.C., Cattabiani F., Bottarelli E. (2003) Batteri enteropatogeni in carne macinata destinata all'alimentazione del cane. L'Igiene Moderna 120: 225-239.
 31. Cabo M.L., Murado M.A., Gonzalez M.P., Pastoriza L. (1999) A method for bacteriocin quantification. J of App Microbiol, 87: 907-914.
 32. Parente E., Brienza C., Moles M., Ricciardi A. (1995) A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. Journal of microbiological methods, 22(1): 95-108.

