



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE VETERINARIA

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO DI SANITA' PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA**

Ciclo XXII

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE COMUNITA' BATTERICHE COINVOLTE NELLA MATURAZIONE DEL FORMAGGIO MONTASIO D.O.P.

Direttore della scuola: Ch.mo Prof. Massimo MORGANTE

Coordinatore di indirizzo: Ch.mo Prof. Mauro DACASTO

Supervisore: Dott.ssa Barbara CARDAZZO

Dottoranda: Lisa CARRARO

31 GENNAIO 2010

A nonna Edvige

Riassunto

In questo studio è stata analizzata la biodiversità microbica durante le fasi di produzione del formaggio Montasio D.O.P utilizzando un approccio coltura-indipendente. Con le metodiche molecolari è possibile estrarre il DNA e l'RNA microbico direttamente dalla matrice formaggio senza utilizzare alcuna metodica colturale di microbiologia classica. Per identificare le popolazioni batteriche del latte crudo e dei campioni di formaggio sono state costruite delle librerie 16S rRNA a partire da DNA e RNA. Il sequenziamento e il T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) sono stati impiegati per l'analisi dei cloni. Il T-RFLP è stato applicato anche per l'analisi diretta delle comunità microbiche presenti nei campioni di Montasio. Saggi in *real-time*PCR quantitativa (qRT-PCR) sono stati messi a punto per rilevare e quantificare tre specie e un genere di batteri lattici (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus spp.*). Un saggio qRT-PCR è stato sviluppato per rilevare *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Enterobacter spp.*, i batteri psicotrofi più comunemente riportati nel latte crudo, sono stati trovati anche nei campioni di latte analizzati in questo studio. *Streptococcus thermophilus*, aggiunto come starter, è stato la specie LAB (*Lactic Acid Bacteria*) predominante attraverso tutto il periodo di maturazione del formaggio Montasio. Anche enterococchi sono stati ritrovati durante le fasi di stagionatura e questi, probabilmente, derivavano dal latte crudo. *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus casei* sono stati rilevati solo nei campioni di formaggio stagionato. Sono stati messi inoltre a punto dei saggi in *real-time*PCR per studiare l'espressione di otto geni implicati nel sistema *quorum-sensing* in *Streptococcus thermophilus*. Questo è stato fatto per verificare l'applicabilità di studi di espressione genica su RNA batterico estratto direttamente dalla matrice formaggio con l'intenzione, in futuro, di utilizzare questa tipologia di studi per la caratterizzazione di funzioni geniche interessanti per la produzione di prodotti lattiero-caseari.

Summary

This study provides a complete view of the composition of the microbial community in Montasio cheese obtained using a culture-independent approach. By molecular direct methods, microbial DNA and RNA were extracted from cheese matrixes without any culturing step. To identify the bacteria populations of raw milk and cheese samples, clone libraries were constructed from the 16S rRNA PCR amplified from DNA (and cDNA). T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) was used to identify clones and to investigate the community structure. *real-time* quantitative PCR (qRT-PCR) assays were also developed to detect and quantify three species and one genus of lactic-acid bacteria (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus spp.*). One qRT-PCR assay was developed to detect *Pseudomonas spp.*, a food spoilage related bacteria. *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* and *Enterobacter spp.*, the most frequently reported psychrotrophs in raw milk, were found also in our milk samples. *Streptococcus thermophilus*, added as starter, was the predominant LAB species throughout the whole ripening period of Montasio cheese. *Enterococci* were also found and they resulted probably from milk. Instead, *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus casei* were detected only in the mature cheeses. Expression analysis of TCS (two component regulatory system) genes were also performed by qRT-PCR. This work was a preliminary study to evaluate the quality and quantity of RNA (extracted from cheese matrix) in gene expression studies.

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Processo tecnologico-substrato-ecosistema microbico	1
1.2 Interazioni all'interno di comunità microbiche	3
1.3 Microflora nei prodotti lattiero-caseari	7
1.4 Batteri lattici	9
<u>1.4.1 Caratteristiche generali</u>	9
<u>1.4.2 Principali gruppi</u>	10
<u>1.4.3 Genetica dei batteri lattici</u>	12
<u>1.4.4 Ruolo tecnologico dei batteri lattici</u>	13
<u><i>1.4.4.1 Metabolismo dei batteri lattici e prodotti lattiero-caseari</i></u>	15
<u><i>1.4.4.2 Gli starter</i></u>	17
<u><i>1.4.4.3. Microflora secondario</i></u>	18
1.5 Montasio D.O.P.	20
1.6 Analisi microbiologiche degli alimenti	23
<u>1.6.1 Metodiche colturali classiche</u>	23
<u>1.6.2 Metodiche alternative e/o nuove</u>	25
<u><i>1.6.2.1 Metodiche molecolari</i></u>	25
<u><i>1.6.2.1.1 Metodiche molecolari che sfruttano la PCR</i></u>	26
<u><i>1.6.2.1.2 Real-timePCR</i></u>	30
<u>1.6.3 Analisi delle comunità microbiche</u>	35
<u>1.6.3.1 Metodiche coltura-dipendenti</u>	37
<u>1.6.3.2 Metodiche coltura-indipendenti</u>	38
2. OBIETTIVO	45
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 Ceppi batterici di riferimento	47
3.2 Campioni di formaggio	48
3.3 Estrazione del DNA	48
3.4 Estrazione dell'RNA	48
3.5 Valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici	49
3.6 Analisi bioinformatiche per messa a punto T-RFLP	50
3.7 T-RFLP su DNA ceppi di riferimento	50
3.8 T-RFLP su campioni di Montasio	51
3.9 Creazione librerie di cloni 16S rRNA	51
3.10 Screening dei cloni 16S rRNA e 16S rRNA con T-RFLP	52
3.11 Sequenziamento dei cloni 16S rRNA	53
3.12 Quantificazione microbica tramite <i>real-time</i>PCR	54
3.13 Espressione dei geni <i>TCS</i> di <i>Streptococcus thermophilus</i>	57

4. RISULTATI	61
4.1 Valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici	61
4.2 Analisi bioinformatiche per messa a punto T-RFLP	62
4.3 Messa a punto T-RFLP sul DNA dei ceppi di riferimento	63
4.4 T-RFLP sui campioni di Montasio	64
4.5 Screening e sequenziamento dei cloni 16S rRNA	66
4.6 Rilevamento e quantificazione batteri nei campioni tramite <i>real-time</i> PCR	71
4.7 Espressione geni <i>TCS</i> tramite RT-PCR in <i>Streptococcus thermophilus</i>	77
5. DISCUSSIONE	79
5.1 Analisi quanti-qualitativa degli acidi nucleici	80
5.2 Clonaggio, sequenziamento, T-RFLP, RT-PCR	80
5.3 Espressione genica	86
6. CONCLUSIONI	89

**Lavoro sperimentale svolto presso il Dipartimento
di Genetica dell'Università Cattolica di Louvain-la-Neuve (Belgio)**

**“Funzionalità e diversità genetica del *locus blp* codificante batteriocine
in *Streptococcus thermophilus*”**

1.INTRODUZIONE	92
1.1 <i>Streptococcus thermophilus</i>	92
1.2 Batteriocine e loro regolazione	93
1.3 <i>Quorum-sensing</i>	96
1.4 Batteriocine in <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>locus blp</i>	97
2. OBIETTIVO	101
3. MATERIALI E METODI	103
3.1 Ceppi di <i>Streptococcus thermophilus</i>	103
3.2 Studi funzionali	103
3.2.1 Metodo “spot-on-lawn”	104
3.2.2 Metodo “multi-layers”	104
3.3 Analisi della diversità genetica del <i>locus blp</i>	104
4. RISULTATI	107
4.1 Studi funzionali	107
4.2 Analisi della diversità genetica del <i>locus blp</i>	108
5. DISCUSSIONE	111
6. CONCLUSIONI	115

1. INTRODUZIONE

1.1 Processo tecnologico-substrato-ecosistema microbico

Per comprendere la crescita dei microrganismi negli alimenti è necessario ragionare in termini ecologici. Le caratteristiche strutturali della nicchia ecologica influenzano le popolazioni microbiche che si possono sviluppare (Mucchetti 2006).

I rapporti e gli equilibri tra microrganismi di diversi generi e specie sono sottoposti a diversi fattori abiotici e biotici: numero e caratteristiche dei microrganismi presenti, presenza di altri microrganismi, i tipi di interazioni che si instaurano, le caratteristiche del substrato, le condizioni ambientali, i parametri del processo e i trattamenti tecnologici (Jany et al., 2008).

C'è una sorta di legame tra i parametri di processo, l'ecosistema microbico e le caratteristiche del substrato. Per parametri di processo si intendono temperature e tempi dei trattamenti, eventuale aggiunta di coadiuvanti, additivi o anche la stessa umidità ambientale. Quando si parla di caratteristiche del substrato si intendono le diverse concentrazioni dei nutrienti, l'acidità, la disponibilità di ossigeno, l'attività dell'acqua e la forza ionica. Da tutte questi fattori dipenderà quali microrganismi riusciranno a prendere il sopravvento e anche le modificazioni della composizione e della struttura del prodotto (Giraffa 2004).

Capire le complesse dinamiche di crescita all'interno dell'ecosistema alimento è importante per garantire la qualità dei prodotti e per le strategie di analisi del rischio che mirano a prevenire la diffusione di batteri deterioranti e patogeni. Inoltre questi studi stanno alla base del potenziale uso di microrganismi nella produzione di cibi fermentati e bevande. La trasformazione per via fermentativa è uno dei metodi più seguiti per la conservazione dei prodotti alimentari e per il miglioramento della loro qualità (Klaenhammer et al., 2005).

Gli alimenti fermentati più noti sono le bevande alcoliche (vino, birra, sidro), tutti i

formaggi, yogurt e i latti fermentati (kefir, koumiss), i salami e le salsicce fermentate, i prodotti da forno e i foraggi insilati. Questi prodotti hanno origine antichissima e gli accorgimenti che tradizionalmente vengono messi in atto per favorire inconsciamente lo sviluppo dei microrganismi utili a scapito di quelli alteranti sono il frutto di esperienze derivanti da pratiche empiriche (Zambonelli 2001).

La fermentazione affidata ai microrganismi naturalmente presenti come contaminanti nella materia prima dà risultati generalmente accettabili ma non garantisce la migliore qualità organolettica e talvolta neppure quella igienico-sanitaria. E' per questo motivo che già da molto tempo si è imposta la necessità di pilotare le fermentazioni con starter microbici selezionati capaci di dare risultati sicuri e prevedibili (Mucchetti 2006).

1.2 Interazioni all'interno di comunità microbiche

In ecologia, il rapporto che si instaura tra due specie viventi che interagiscono per il cibo, viene definito interazione trofica interspecifica. Ogni interazione di questo tipo comporta per ciascuna delle due specie interagenti un impatto, che teoricamente può essere positivo, negativo o assente. Anche tra ceppi appartenenti a generi o specie differenti o tra ceppi differenti della stessa specie si possono instaurare complessi rapporti di interazione (Sieuwerts et al, 2008).

Le interazioni nulle avvengono con maggiore probabilità e semplicità qualora ci sia una bassa densità della popolazione, che determina una maggiore difficoltà di contatto tra gli individui delle popolazioni, piuttosto che ad alte intensità di popolazioni microbiche che facilita il contatto e quindi l'eventuale interazione (Nandy et al., 2007). Talvolta, basse densità di popolazioni e la formazione di fasi stazionarie possono indurre la formazione di nicchie temporali e spaziali separate in uno stesso ambiente, facilitando la coesistenza di molte popolazioni senza competere per la stessa fonte o risorsa dell'ambiente. La via metabolica dell'uno non interferisce né influenza positivamente la crescita o le attività metaboliche dell'altro (Tremante et al., 2004).

Le interazioni positive che si instaurano tra due popolazioni biologiche aumentano la capacità e l'abilità delle popolazioni di interagire per la sopravvivenza della comunità in un particolare ambiente; talvolta, favoriscono la coesistenza di popolazioni che singolarmente non potrebbero esistere. Lo sviluppo di interazioni positive permette ai microrganismi di utilizzare le risorse disponibili, in rapporto alle concentrazioni dei singoli elementi, in maniera più efficace rispetto alla possibilità dimostrata da una sola popolazione microbica in crescita separata. Le interazioni negative possono manifestarsi nella eliminazione o nella soppressione di una popolazione, che non è bene adatta in quel determinato ambiente, a favore dell'altra. In comunità stabili le interazioni negative garantiscono il mantenimento di un equilibrio tra le popolazioni di una comunità

biologica. Le interazioni negative funzionano come un meccanismo di regolazione retroattivo limitando la densità delle popolazioni che si traduce in un vantaggio per l'intera popolazione in quanto previene un eccesso di individui ed il conseguente esaurimento delle risorse dell'habitat. Spesso le interazioni negative che si instaurano tra i differenti microrganismi assumono un effetto positivo nei processi fermentativi, promuovendo la sicurezza sanitaria del prodotto o assicurando la mancanza di microrganismi indesiderati. Al fine di garantire e migliorare le qualità e la sicurezza microbiologica degli alimenti o di determinati substrati, l'attenzione è sempre più focalizzata verso un approccio, definito nel suo complesso con il termine di "bio-conservazione", che implica l'impiego di batteri o di prodotti del loro metabolismo in grado di controllare la crescita di microrganismi indesiderati. Nello specifico, all'interno di una popolazione microbica si possono instaurare questi possibili rapporti: l'amensalismo, la competizione, il commensalismo, il parassitismo, il mutualismo, forme di cannibalismo e forme di fratricidio. L'amensalismo si verifica quando un microrganismo danneggia gli altri senza colpire se stesso (es. quando vengono prodotti acidi carbossilici e alcoli che inibiscono la crescita di microrganismi deterioranti). Il metabolismo dei LAB è ottimizzato per ottenere una rapida acidificazione piuttosto che per una crescita effettiva. Un altro esempio è la produzione di batteriocine. Di solito i ceppi produttori di batteriocine producono un sistema di protezione che protegge l'ospite dagli effetti deterioranti (Abee et al., 1995). La competizione si verifica quando i microrganismi competono per le fonti di energia e di nutrienti durante la fermentazione. Di solito le fonti di carbonio sono presenti in grandi concentrazioni negli alimenti e quindi la competenza riguarda il rapido recupero di carbonio e la conversione in biomassa. Nelle fermentazioni casearie l'azoto è fattore limitante e quindi inizialmente i microrganismi competono per gli aminoacidi liberi e poi per i piccoli peptidi presenti nel latte. Nelle ultime fasi di fermentazione si attivano particolari sistemi di trasporto e

proteasi e peptidasi. La crescita e le dinamiche delle popolazioni in una comunità mista sono influenzate dalla capacità di usare efficientemente gli aminoacidi. Anche microelementi come il ferro sono fattori limitanti. Il commensalismo si verifica invece quando un microrganismo beneficia dell'interazione con un altro, ma questo non ne risulta danneggiato. Un esempio sono i formaggi di tipo svizzero dove i batteri propionici usano l'acido lattico prodotto dai batteri lattici. Un altro esempio è la situazione presente nel formaggio Gouda dove ceppi di *Lactococcus lactis* Prtp- beneficiano dei peptidi rilasciati dalle proteine del latte attraverso l'azione di proteasi extracellulari prodotte dai ceppi Prtp+ mentre questi ultimi non ne risultano danneggiati. Nel latte i Prtp+ producono più biomassa delle varianti Prtp- che mancano del plasmide che contiene il gene per le proteasi ma la crescita è più lenta dovuta alla spesa per l'espressione di queste proteasi. In una coltura pura di Prtp+ presto si ritroveranno anche Prtp-. Il ceppo che fa minimo uso di energia alla fine diventa il dominante. Forme di parassitismo si verificano invece quando una specie trae beneficio a spese di un'altra. Un esempio è quello dei batteriofagi. L'attacco dei fagi potrebbe inattivare all'improvviso i ceppi dominanti in una coltura in fermentazione. La biologia dei batteriofagi è stata ben studiata in *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*.

Si parla di mutualismo quando entrambe le specie batteriche in questione riescono a trarre beneficio dall'interazione per esempio producendo sostanze che da soli non sarebbero in grado di produrre (Siewerts et al, 2008).

Classica tipologia di sinergia microbica nel campo degli alimenti è quella presente nello yogurt, dove la produzione dell'acido lattico e la degradazione proteica sono amplificate dallo sviluppo contemporaneo di batteri lattici appartenenti alle specie *Lactobacillus delbruechii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Bury et al., 1998).

Altro esempio è il caso del kefir dove è presente una stretta relazione tra lieviti e batteri (Lopitz-Otsoa et al., 2006).

In alcuni casi si verificano situazioni in cui le sostanze antimicrobiche prodotte dal batterio sono dirette verso cellule geneticamente uguali o molto vicine al ceppo produttore. Si parla di cannibalismo in *Bacillus subtilis*. Durante le prime fasi di sporulazione una frazione di cellule della popolazione inizia a secernere dei fattori extracellulari che lisano le cellule che non hanno sviluppato l'immunità a questi composti. Questa situazione porta al rilascio di nutrienti che poi le cellule sopravvissute sono in grado di prendere. Si parla invece di fratricidio nel caso di *Streptococcus pneumoniae* dove lo stato di competenza alla naturale trasformazione batterica porta all'espressione di tossine che lisano cellule *sibling* non competenti presenti nella stessa nicchia. Si parla invece di “suicidio altruistico” quando, in particolari situazioni estreme, i batteri riescono ad attivare un programma di morte cellulare per liberare nutrienti che poi le cellule *siblings* possono prendere (Sieuwerts et al, 2008).

1.3 Microflora nei prodotti lattiero-caseari

I microrganismi presenti nei prodotti di trasformazione del latte sono sostanzialmente riconducibili alla sommatoria di quelli presenti inizialmente nel latte crudo, di quelli aggiunti dall'uomo sotto forma di starter o di quelli che derivano dalle attrezzature, dagli ingredienti (ad esempio il caglio), dall'ambiente di lavorazione e di stagionatura del formaggio. Questi microrganismi possono essere virtuosi, patogeni o deterioranti.

La presenza di batteri nel latte appena munto è dovuto al fisiologico passaggio di microrganismi dall'ambiente di mungitura al prodotto. Tuttavia la presenza batterica risente in modo determinante dello stato dell'apparato mammario, delle condizioni igieniche dell'ambiente e dell'efficienza e regolarità delle operazioni di pulizia dell'apparato di mungitura e dei serbatoi di raccolta del latte. Nei prodotti fermentati è la tecnologia di trasformazione che indirizza lo sviluppo fermentativo e promuove la selezione dei microrganismi necessari rispetto a quelli dannosi. Lo sviluppo dei diversi microrganismi induce nuove modificazioni del substrato che, a loro volta, esercitano pressioni selettive sulla comunità microbica del prodotto. Nel prodotto finito spesso non si ritrovano tutti i microrganismi che si sono sviluppati nelle diverse fasi di trasformazione, ma solo i batteri che hanno resistito alla selezione imposta dalla fermentazione e dai parametri tecnologici di trasformazione e di stagionatura (Mucchetti 2006).

I batteri virtuosi o utili sono quei microrganismi il cui sviluppo provoca effetti positivi nei prodotti alimentari. Essi sono rappresentati da batteri lattici starter o appartenenti alla microflora secondaria (Baresford et al. 2001). I batteri lattici sono spesso accompagnati da altri gruppi come batteri propionici, muffe e lieviti. A questi vanno aggiunti i bifidobatteri che sono riconosciuti come batteri probiotici e che, quindi, sanno influenzare positivamente la salute dell'uomo. I batteri deterioranti non patogeni inficiano la qualità del latte e limitano la *shelf-life* dei prodotti da esso derivanti

producendo enzimi lipolitici e proteolitici in grado di determinare problemi di rancidità e di sapore amaro nei formaggi. Possono portare a difetti nella struttura del prodotto e portare ad acidificazione involontaria. Tra i batteri che causano il deterioramento del latte si spesso si ritrova *Pseudomonas fluorescens* Anche *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* possono causare problemi di deterioramento in quanto le loro spore sono in grado di sopravvivere e germinare anche durante i processi di pastorizzazione (Marco et al., 2008).

Patogeni umani che sono stati rilevati in campioni di latte includono: *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli* enteroemorragica, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*. Questi patogeni sono spesso legati alle condizioni dell'allevamento e ai sistemi di stoccaggio e sono stati trovati sia in latte non pastorizzato che pastorizzato. In genere nei prodotti pastorizzati i batteri che non producono spore sono in genere inattivati, ma se la contaminazione con i batteri patogeni avviene dopo la pastorizzazione, potrebbero esserci fenomeni di proliferazione di questi batteri nel prodotto (Mucchetti 2006).

1.4 Batteri lattici

1.4.1 Caratteristiche generali

I batteri lattici (LAB) sono un gruppo di microrganismi che produce acido lattico come principale prodotto della fermentazione dei carboidrati. Sono batteri Gram positivi, eterotrofi, non mobili, non sporigeni, anaerobi obbligati o facoltativi, acido tolleranti e talvolta acidofili. Tollerano bene un'elevata acidità, dato che alcune specie continuano a crescere fino a circa pH 3. Sono privi di catalasi, di nitrato riduttasi e di citocromo ossidasi, infatti non hanno catena respiratoria e il loro metabolismo è fermentativo. Sono ampiamente diffusi in natura, prediligono ambienti ricchi di nutrienti. Si ritrovano in diversi ambienti: carne, verdure, vino, caffè, insilati, cacao, pasta acida, nelle superfici delle mucose del corpo umano (nella vagina, nella cavità orale e nel tratto gastro-intestinale) (Klaenhammer et al., 2005). I batteri lattici sono considerati sicuri per la salute umana e per questo sono chiamati anche con l'acronimo GRAS (*generally recognized as safe*). Proprio perchè sicuri per la salute dell'uomo sono utilizzati nella trasformazione e conservazione degli alimenti. Sono in grado di inibire la microflora indesiderata e patogena, hanno proprietà acidificanti, aromatizzanti e probiotiche. C'è quindi un interesse industriale a selezionare ceppi con determinate caratteristiche tecnologiche (Martin-Platero et al., 2008). Sono in grado di produrre sostanze con attività antibatterica quali acido lattico, etanolo, batteriocine, acqua ossigenata e acidi deboli. Lo sviluppo dei LAB porta ad una diminuzione del potenziale di ossidoriduzione che da positivo può diventare altamente negativo. C'è un certo interesse di utilizzare i LAB anche in campo farmaceutico, c'è sempre una maggiore attenzione nei loro confronti per essere usati come veicoli per il trasporto di farmaci e vaccini per la loro capacità di raggiungere il tratto gastro-intestinale e interagire col sistema immunitario dell'ospite. E' un gruppo particolarmente variegato sia per la morfologia (*Lactobacillus* e *Carnobacterium* di forma bastoncellare, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*,

Enterococcus, *Oenococcus* e *Pediococcus* di forma coccica)(Mucchetti 2006).

1.4.2 Principali gruppi

Orlan-Jensen ha posto le basi per una prima possibile classificazione mentre attualmente per una classificazione fenotipica dei batteri lattici si fa riferimento al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Genere *Lactococcus*

Il genere è ascritto alla famiglia *Streptococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *bacilli*, phylum *Firmicutes*. Questi batteri di forma coccica, sono disposti in catene di lunghezza variabile, hanno un metabolismo omofermentativo e producono esclusivamente L(+) acido lattico. Si distinguono per la presenza, nel loro sviluppo, dell'antigene del gruppo N, per il carattere debolmente α -emolitico e non β -emolitico, per la temperatura minima di crescita inferiore o uguale a 10°C e quella ottimale vicina a 30°C, per la termosensibilità e l'incapacità di crescere in presenza del 6,5% di NaCl e a pH di 9,6 (Bergey's Manual 2005).

Genere *Enterococcus*

Il genere è classificato nella famiglia *Enterococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Gli enterococchi hanno un metabolismo omofermentativo e producono L(+) acido lattico. Si possono generalmente distinguere dagli altri batteri lattici a forma di cocco per la presenza dell'antigene del gruppo D e per la loro capacità di crescere a 10 e 45°C, in presenza del 6,5 % di NaCl o del 40% di bile e a pH 9,6. Alcune specie, tra le nuove identificate, tuttavia, non possiedono tutte queste caratteristiche. Gli enterococchi sono ospiti normali del tratto intestinale degli animali a sangue caldo, ma sono anche presenti sulle piante e tra gli insetti. Molte specie possono avere un carattere patogeno (Bergey's Manual 2005).

Genere *Leuconostoc*

I batteri appartenenti al genere *Leuconostoc* appartengono alla famiglia delle *Leuconostocaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Le cellule sono sferiche e spesso lenticolari soprattutto quando crescono in substrati agarizzati, si presentano singolarmente in catenelle. Sono Gram positivi, non mobili, non sporigeni e facoltativamente anaerobi. Le colonie sono piccole, meno di 1 mm di diametro, tondeggianti, lisce, grigio- bianche. Il brodo colturale è generalmente torbido ma se si originano catene particolarmente lunghe esse tendono a precipitare. La temperatura ideale è di 20-30°C e perché possano sviluppare è necessario un intervallo di temperatura che va da 5 a 30°C. Lo sviluppo di questi batteri è strettamente legato alla presenza nel mezzo di alcuni aminoacidi, quali acido nicotico, tiamina, biotina ed acido pantotenico od altri acidi derivati. Il loro sviluppo dipende dalla disponibilità di carboidrati fermentescibili. Nel corredo enzimatico l'1-6 difosfofruttosio aldolasi è assente, mentre è presente la 6 glucosiofosfato deidrogenasi che, dal glucosio, origina anidride carbonica e D- ribulosio 5 fosfato. La xilulosio-5-fosfato fosfo-chetolasi determina la produzione di etanolo e D-(-)-acido lattico. Il malato può essere utilizzato e convertito in L-(+)-lattato. L'arginina non è idrolizzata ed il latte non è generalmente acidificato (Bergey's Manual).

Genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* appartiene alla Famiglia delle *Lactobacillaceae*, Ordine *Lactobacillales*, Classe *Bacilli* del Phylum *Firmicutes*. Sono microrganismi Gram-positivi, anaerobi o anaerobi facoltativi, catalasi negativi, asporigeni, immobili, salvo alcune eccezioni. Le cellule sono di forma regolare, allungate, sottili, possono essere avvolte, corte e ricurve, formano lunghe catene. Sono microrganismi eterofermentanti e omofermentanti, microaerofili, con punti di temperature variabili, il valore di pH ottimale è tra 5,5-6,2. Il genere comprende differenti specie suddivise in 3 gruppi:

Lattobacilli omofermentanti, Lattobacilli omofermentanti e eterofermentanti facoltativi, Lattobacilli eterofermentanti obbligati (Bergey's Manual 2005).

Genere *Pediococcus*

I pediococchi appartengono alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Questi batteri hanno un metabolismo omofermentativo e producono, a partire dagli esosi, acido lattico DL o L(+), a seconda delle specie. Le cellule sono sferiche, mai allungate, raramente isolate e non formano mai catene. Si dividono alternativamente in due piani perpendicolari, che determinano la formazione di tetradi; tutte le specie sviluppano bene a 30° C, ma la loro temperatura ideale di crescita è compresa tra 25 e 40° C, a seconda della specie. Sono esigenti in fattori di crescita e aminoacidi e richiedono terreni particolarmente ricchi. La loro scarsa attività proteolitica e la generale incapacità di fermentare il lattosio, li rendono incapaci di coagulare il latte (Bergey's Manual 2005).

1.4.3 Genetica dei batteri lattici

La prima classificazione di Orla-Jensen (1919), così come quelle dei successivi 40 anni, era basata su caratteristiche fenotipiche, mentre le più recenti classificazioni comprendono, oltre le caratteristiche fenotipiche, anche il grado di omologia del DNA, la composizione in basi (% G+C) e il sequenziamento di geni quali quelli del 16S rRNA che presenta incisa nella sua sequenza nucleotidica la storia evolutiva del microorganismo. Si parla di una sorta di filosofia tassonomica che vuole integrare diverse informazioni e che si avvale del contributo di diverse discipline (biologia molecolare, biochimica, morfologia, fisiologia, ecologia microbica, genetica, statistica). E' in corso una revisione continua della tassonomia delle *Lactobacillales* attraverso, ad esempio, l'utilizzo di alberi filogenetici basati su allineamenti concatenati di proteine ribosomali (Makarova et al. 2006). Nel Febbraio 2009 i genomi di batteri lattici sequenziati e

annotati erano 25 ed attualmente molti altri progetti di sequenziamento sono in fase di sviluppo (N.C.B.I., *national center for biotechnology information*). La maggior parte dei LAB ha genomi piccoli di 1,8-3,3 Mb e il numero di geni codificanti proteine varia da 1700 a 3200 indicando eventi di “*gene loss*” e “*gene gain*” durante la loro storia evolutiva. Analisi di genomica comparativa hanno mostrato come molti geni legati a vie biosintetiche siano stati persi e come la capacità ad utilizzare nutrienti dall'esterno sia stata favorita attraverso l'acquisizione di geni implicati nel metabolismo degli zuccheri e di aminoacidi tramite trasferimento genico orizzontale o duplicazione genica. C'è stata semplificazione metabolica e perdita di geni ancestrali e quindi si può dire che il trend evolutivo è di tipo riduttivo per l'adattamento a nicchie ricche di nutrienti. Il fenotipo di digestione degli zuccheri si è evoluto in modo indipendente in diverse linee batteriche, quindi apparentemente non è richiesto un unico set di geni ma il fenotipo è emerso piuttosto attraverso un assortimento e un adattamento di enzimi condivisi con altri batteri (Hols et al., 2005) Possiedono pseudogeni e il loro numero varia molto tra le specie (da meno di 20 in *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus* a circa 200 in *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii*). La presenza di pseudogeni è una chiara evidenza della recente e continua riduzione del genoma. Rispetto ad altri gruppi di batteri i batteri lattici presentano un numero elevato di pseudogeni e questa rappresenta una caratteristica comune di batteri che si sono adattati ad ambienti ricchi di nutrienti. I LAB presentano un numero variabile di operoni rRNA (2 in *Oenococcus oeni*, 9 in *Lactobacillus delbrueckii*) e il diverso numero di operoni riflette le differenze nella competizione ecologica (Makarova et al., 2007).

1.4.4 Ruolo tecnologico dei batteri lattici

I LAB sono molto importanti nella trasformazione e conservazione nei prodotti lattiero-caseari, sono in grado di inibire la microflora indesiderata e patogena, hanno attività

acidificanti, aromatizzanti e probiotiche. C'è un interesse industriale a selezionare ceppi con determinate caratteristiche o a modificare i microrganismi per renderli più idonei a specifiche attitudini. Il processo che porta alla formazione del formaggio a partire dal latte è chiamato caseificazione e può essere riassunto in alcune fasi principali comuni a tutti i formaggi: acidificazione, coagulazione, deidratazione, formatura e salatura. Tali processi influiscono in maniera determinante sulla definizione del tipo e della qualità del prodotto finito; tuttavia è durante la fase di maturazione che ogni tipo di formaggio acquisisce struttura e aroma caratteristici, in seguito ad una serie di reazioni biochimiche complesse dovute sia all'attività dei batteri starter, degli starter secondari e dei microrganismi non starter, sia all'attività degli enzimi coagulanti ed endogeni del latte (De Felip 2001). Le condizioni di ogni gruppo microbico in ciascuna fase della stagionatura dipendono da numerosi fattori, tra i quali i principali sono il Ph, il contenuto in sale, l'attività dell'acqua e il contenuto di umidità. Inoltre va considerato come formaggi prodotti da latte non pastorizzato o attraverso procedure artigianali siano in possesso di una microflora estremamente ricca e variegata, che è responsabile delle caratteristiche organolettiche del prodotto stesso (Marino et al., 2003).

Tra i prodotti lattiero-caseari, in modo grossolano si possono definire alcune categorie:

I. Formaggio a latte pastorizzato con innesto selezionato\commerciale: si tratta di un prodotto altamente standardizzato. La diversità microbica è limitata e dipende dallo starter. Può esserci comunque una specificità dei singoli processi aziendali, come nel caso del Pecorino toscano dove la microflora ambientale prende comunque il sopravvento.

II. Formaggio a latte pastorizzato con innesto naturale\artigianale: la fonte di variabilità dipende dallo starter utilizzato e può essere una fonte indefinita di biodiversità.

III. Formaggio a latte termizzato con innesto naturale\artigianale: la diversità

microbica è lo specchio della composizione dello starter e in misura minore anche del latte come nel caso del Pecorino romano.

IV. Formaggio a latte crudo con innesto selezionato\commerciale: in questo caso è lo starter che indirizza la fermentazione. C'è un'ampia diversità dovuta alle materie prime utilizzate, all'ambiente produttivo.

V. Formaggio a latte crudo con innesto naturale: la biodiversità è maggiore rispetto al formaggio a latte crudo con innesto selezionato\commerciale perchè in quanto oltre alle materie prime e all'ambiente lavorativo la variabilità è dovuta anche per lo starter usato (Mucchetti 2006).

1.4.4.1 Metabolismo dei batteri lattici e prodotti lattiero-caseari

Durante la maturazione del formaggio avvengono reazioni biochimiche che permettono la formazione di particolari aromi. I composti che caratterizzano questi aromi derivano dai tre maggiori costituenti del latte: lattosio, lipidi e proteine (Marilley et al., 2004).

La fermentazione del lattosio è il processo biochimico fondamentale nella produzione dei derivati del latte. Il processo fermentativo che deriva dallo sviluppo della microflora lattica comporta la totale o parziale utilizzazione degli zuccheri fermentabili presenti che vengono sottratti al potenziale impiego da parte dei germi alterativi e induce la modificazione delle caratteristiche chimico-fisiche della matrice conseguenti all'accumulo dei metaboliti primari quali l'acido acetico, l'alcol etilico e la CO₂. L'acidificazione del latte inoltre rende il substrato meno ospitale per la gran parte delle specie microbiche e può anche favorire la coagulazione enzimatica nel caso dei processi di caseificazione e può portare alla gelificazione del latte nel caso dello yogurt. Le modificazioni strutturali della matrice latte indotte dalla fermentazione svolgono perciò un ruolo centrale nella definizione delle caratteristiche del prodotto. Si distinguono in omofermentanti ed eterofermentanti. Nel primo caso da una molecola di

monosaccaride come il glucosio ottengono una resa teorica di due molecole di acido piruvico che in condizioni normali sono ridotte ad acido lattico. Nella fermentazione eterolattica è caratteristico il processo di decarbossilazione con liberazione di CO₂ e produzione di acido lattico, etanolo e aldeide acetica (Mucchetti 2006).

La proteolisi è un processo importante nei formaggi duri e semi-duri. Nei LAB la degradazione di caseine e peptidi porta alla formazione di aminoacidi liberi e la conversione di ogni aminoacido porta alla liberazione di composti volatili specifici. Gli enzimi coinvolti sono quelli del caglio, delle colture aggiunte o quelli dei batteri lattici non starter. I LAB sono batteri particolarmente esigenti in aminoacidi. Le proteine del latte sono organizzate in micelle troppo grandi per permeare nel citoplasma attraverso la parete e la membrana della parete batterica. La frazione azotata non proteica del latte non è sufficiente. Per potersi moltiplicare nel latte devono idrolizzare le caseine e le sieroproteine attraverso endo ed esopeptidasi (Marilley et al., 2004).

Un altro processo biochimico importante è la lipolisi, molti ceppi sanno produrre esopolisaccaridi che possono rimanere attaccati alla parete oppure possono formare capsule rilasciate nel mezzo (e potrebbero avere anche un ruolo nel formare biofilm) (Mucchetti 2006). Le proprietà tecnologiche e la capacità a produrre particolari aromi è ceppo dipendente. Come regola generale i termofili sono più proteolitici dei mesofili. Lo studio delle relazioni tra capacità a formare particolari aromi e le caratteristiche genotipiche permetterà di usare le informazioni molecolari per creare nuovi isolati di interesse tecnologico. Le informazioni ottenute dal sequenziamento di interi genomi e le informazioni attualmente disponibili sui LAB danno nuove opportunità per comprendere meglio la formazione degli aromi. L'utilizzo di particolari starter di *Lactococcus lactis* ricombinanti con peptidasi di *Lactobacillus* possono aumentare le capacità peptidasiche durante la stagionatura del formaggio (Marilley et al., 2003, Sieuwertz et al., 2008).

1.4.4.2 Gli starter

Fino all'inizio del '900 tutti i formaggi erano prodotti senza l'aggiunta di innesto in quanto per realizzare il processo di caseificazione e di maturazione del formaggio si utilizzava, consapevolmente o inconsapevolmente, la microflora del latte crudo. L'intollerabile numero di difetti dovuti alla fermentazione "selvaggia" ha portato all'introduzione dell'innesto o *starter*. Il lattoinnesto è una coltura di batteri lattici spontaneamente presenti nel latte, mentre il sieroinnesto è una coltura di batteri lattici che cresce nel siero di fine caseificazione. In funzione del tipo di formaggio, i batteri lattici impiegati come starter appartengono al gruppo dei mesofili (temperatura di crescita, 20-40°C) o dei termofili (temperatura di crescita, 30-55°C). I primi sono rappresentati essenzialmente da *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e subsp. *lactis* e da *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Gli starter termofili, principalmente a metabolismo omofermentante, sono rappresentati da *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Il loro impiego, anche in associazione con starter mesofili, è caratteristico della produzione della maggior parte dei formaggi di tipo svizzero e di molti formaggi italiani, come Parmigiano Reggiano, Pecorino Romano, Provolone, Montasio e altre varietà nella cui tecnologia è necessaria un'elevata acidificazione della cagliata e dove è necessaria un'elevata temperatura di cottura (De Felip 2001; Mucchetti 2006).

La selezione di batteri lattici per la produzione di formaggi avviene con l'individuazione di ceppi in possesso di particolari caratteristiche quali:

I.vigore fermentativo: esprime la prontezza e la rapidità con la quale il ceppo dà luogo alla fermentazione.

II.potere acidogeno: è in diretto rapporto con la capacità di sviluppare ancora bene ai più bassi valori di pH.

III.formazione di gomme: capacità di formare polisaccaridi extracellulari che

conferiscono vischiosità ai mezzi.

IV. produzione di batteriocine: produzione di composti peptidici antimicrobici con proprietà inibitrici su altre specie microbiche ed anche su ceppi della medesima specie.

Il carattere è considerato positivo perchè conferisce competitività.

V. resistenza al lisozima: il lisozima è un enzima naturale che ha la capacità di idrolizzare i polisaccaridi della parete cellulare batterica.

VI. resistenza al batteriofago: i batteriofagi sono virus parassiti di batteri.

VII. produzione di composti aromatici

VIII. produzione di amine: si tratta di un carattere negativo e la selezione deve essere orientata verso quei ceppi che non la possiedono (Mucchetti 2006).

1.4.4.3. Microflora secondaria

Tra i microrganismi non starter, un ruolo importante nella fase di maturazione è riconosciuto ad alcune specie di batteri lattici mesofili, indicati come “*Non Starter Lactic Acid Bacteria*” o “NSLAB”. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus spp.* e di *Pediococcus spp.*, sono considerate i più importanti NSLAB. Dopo il decremento dei microrganismi starter, durante le prime fasi della maturazione, la popolazione dei NSLAB nel formaggio tende ad aumentare notevolmente, passando da ca. 10^4 - 10^6 ufc/g a ca. 10^7 - 10^8 ufc/g per poi rimanere costante durante il successivo periodo di maturazione. I lattobacilli mesofili, insieme ad alcuni stafilococchi ed enterococchi, possono quindi essere considerati come parte integrante della microflora avventizia del latte. In generale, le fonti dei NSLAB sono il latte crudo, le colture naturali, gli ambienti di produzione e quelli di maturazione (De Felip 2001). Numerose specie sono riconosciute appartenenti alla microflora secondaria e possono avere una distribuzione quanti-qualitativa variabile che dipende da diversi fattori. Gli

enterococchi, in particolare *E. faecium* e *E. faecalis*, possono resistere a temperature di 62,8°C per 30 minuti, a pH molto bassi e in condizioni di salinità piuttosto elevate. Hanno un ruolo controverso perchè, sebbene siano generalmente considerati microrganismi indesiderati, possono contribuire allo sviluppo delle caratteristiche organolettiche, grazie ai loro metaboliti secondari, e inibire batteri patogeni quali *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium* spp. e *V. cholerae* grazie alla produzione di batteriocine (Giraffa et al., 2003). Essi possono sopravvivere al processo di pastorizzazione o ritrovarsi nel latte o nella cagliata in seguito a contaminazioni post-pastorizzazione. I formaggi tradizionali (spesso a latte crudo, prodotti artigianalmente) mostrano un'ampia diversità specialmente in NSLAB eterofermentanti (*Leuconostoc*, *L. fermentum* e *L. brevis*) mentre, nei formaggi a lunga maturazione, si ritrovano perlopiù *L.casei*, *L.plantarum*, pediococchi ed enterococchi (Zambonelli 2001; Mucchetti 2006). Nei formaggi D.O.P.e tradizionali italiani sono stati ritrovati anche *S. macedonicus*, una specie “*Streptococcus thermophilus*-like”, isolato normalmente in formaggio greco Kasserì (Tsakalidou et al.; Gatto et al., 2002). *E. italicus*, in precedenza isolato da prodotti caseari belgi, rumeni e marocchini è stato isolato anche da Toma e Robiola piemontesi, due formaggi artigianali (Vancanneyt et al., 2004).

1.5 Montasio D.O.P.

Il Montasio D.O.P. (Denominazione di Origine Protetta) è un formaggio a pasta dura, cotto, prodotto esclusivamente con latte di vacca di media e lunga stagionatura.

Le caratteristiche del formaggio Montasio sono riportate all'art. 1 del D.P.R. 30 ottobre 1955, n. 1269. "Formaggio grasso a pasta dura, cotta, prodotto esclusivamente con latte di vacca. È salato a secco oppure in salamoia leggera con completamento a secco. Viene usato da tavola quando la stagionatura ha raggiunto i due mesi e non superato i cinque, o da grattugia quando la stagionatura ha raggiunto almeno i dodici mesi. Maturo, presenta le seguenti caratteristiche: forma cilindrica, a scalzo basso diritto o quasi diritto, con facce piane o leggermente convesse; peso medio di una forma: da 5 a 9 Kg, con variazioni, in più o in meno, in rapporto alle condizioni tecniche di produzione; dimensioni: altezza cm 6-10; diametro cm 30-40, con variazioni, in più o in meno, per entrambe le caratteristiche, in rapporto alle condizioni tecniche di produzione; crosta: liscia, regolare, elastica; pasta: per il formaggio da tavola, compatta, con leggera occhiatura, di colore naturale leggermente paglierino; per il formaggio da grattugia, friabile, di colore paglierino, con pochi e piccolissimi occhi; aroma caratteristico e sapore piccante e gradevole; grasso sulla sostanza secca: minimo 40%".

Nel 1984 è stato costituito il *Consorzio per la Tutela del Formaggio Montasio*, che ha regolamentato la tecnologia di produzione da adottare nel territorio in attesa del riconoscimento ufficiale del D.P.R. del 1986, con il quale è stato attribuito al consorzio il ruolo di vigilare sull'intero ciclo di produzione (dall'alimentazione delle bovine da latte fino al commercio) e di essere il depositario dei marchi di origine e garanzia. La zona di produzione del formaggio Montasio, comprendente l'intera regione del Friuli Venezia-Giulia, le province di Belluno e Treviso e una piccola parte delle province di Padova e Venezia, è stata definita con D.P.R. 10 marzo 1986, decreto che ha riconosciuto al formaggio Montasio il marchio D.O.C. Tale decreto modifica quanto

stabilito dall'art. 2 del D.P.R. 30 ottobre 1955, n. 1269, che denominava il formaggio Montasio come "tipico". Il 14 luglio 1992 il Consiglio CEE ha emanato il regolamento 2081/92 relativo alla protezione della denominazione d'origine (D.O.P). Il formaggio Montasio ha avuto il riconoscimento di D.O.P. il 6 marzo 1996. Si usa esclusivamente latte di vacca, la cui alimentazione esclude l'uso di colza, barbabietola, insilati ecc. ma permette quello di fieno-silos e silo-mais. Si usa latte prodotto esclusivamente nella zona di fabbricazione. Tradizionalmente il latte era trasformato crudo. Il disciplinare prescrive che "il latte non deve essere sottoposto a trattamento di pastorizzazione e deve presentare un'analisi della fosfatasi chiaramente positiva". Tale prescrizione sembra ammettere, quindi, la possibilità di termizzare il latte. Tradizionalmente non si usava l'innesto, oppure si usava una sierocoltura termofila. Alla fine degli anni settanta si rileva l'uso del lattoinnesto naturale cui segue quello di lattoinnesti selezionati. Il disciplinare indica genericamente "aggiunta di innesto\fermento naturale selezionato". La microflora normalmente presente è costituita da batteri lattici dell'innesto e flora del latte crudo. Sono stati identificati prevalentemente *S.thermophilus*, enterococchi, lattobacilli termofili omo ed etero-fermentanti, lattobacilli mesofili e pediococchi (Citterio et al. 1995). E' consentito l'uso di lisozima come additivo.

Nel disciplinare di produzione del formaggio "Montasio" D.O.P. si legge la sequenza operativa da rispettare:

- 1) riscaldamento del latte a 32-36°C;
- 2) aggiunta innesto/fermento naturale selezionato;
- 3) aggiunta caglio di vitello in polvere o liquido;
- 4) coagulazione del latte;
- 5) rottura della cagliata con lira fino ad ottenere granuli della dimensione di un chicco;
- 6)cottura a 42-48°C per circa 40 minuti e spinatura fuori fuoco per un tempo complessivo di 15/30 minuti;

- 7) estrazione della cagliata;
- 8) pressatura e rivoltamento delle forme;
- 9) marchiatura all'origine con apposizione del codice del caseificio e della sigla della provincia e la data di produzione (anno, mese e giorno);
- 10) salatura a secco oppure in salamoia leggera con eventuale completamento a secco;
- 11) stagionatura minima di 60 giorni a temperature non inferiori a 8 °C per i primi 30 giorni e superiori nel prosieguo della stagionatura.

1.6 Analisi microbiologiche degli alimenti

L'analisi microbiologica degli alimenti assume significati diversi in base al campione da analizzare e può avere svariati scopi. Oggetto di studio sono i batteri che compongono l'ecosistema "alimento": microrganismi pro-tecnologici e probiotici, patogeni, anti-tecnologici o alterativi. Si può valutare la presenza\assenza di alcuni di questi microrganismi, la presenza complessiva di tutti i batteri presenti oppure si può volere una quantificazione. Si possono ottenere informazioni relative all'origine, alla biologia, all'ecologia, alle attività metaboliche e alla sistematica di questi batteri valutando il loro ruolo e il loro comportamento nei diversi ecosistemi alimentari. Un punto cruciale è la preparazione del campione ed è necessario considerare che la distribuzione potrebbe non essere uniforme, potrebbero esserci sostanze o altri microrganismi che potrebbero interferire con l'analisi e infine bisogna considerare che le cellule potrebbero essere danneggiate dai processi tecnologici a cui viene sottoposto l'alimento. Quindi il campione deve essere rappresentativo di tutto il prodotto da analizzare e bisogna fare attenzione alla contaminazione della microflora esogena. Le metodiche colturali "tradizionali classiche" sono riconosciute ufficialmente come metodi di analisi e il termine "tradizionale" non significa che siano superate o desuete anche se indubbiamente mostrano dei limiti che verranno affrontati in dettaglio più avanti.

Attualmente, oltre queste metodiche classiche, sono disponibili nuovi metodi di identificazione e quantificazione che si sono sviluppate per rispondere all'esigenza di avere tecniche più sensibili, più veloci, automatizzate ed economiche (Mucchetti 2006).

1.6.1 Metodiche colturali classiche

Si basano sulla metodica di Koch e Petri in riferimento alle capacità dei microrganismi di moltiplicarsi e formare colonie una volta incubati in condizioni e tempi definiti in appositi substrati. Vengono utilizzati terreni selettivi, terreni arricchiti, terreni differenziali e terreni di arricchimento.

Si utilizza ad esempio il PCA per la conta totale in aerobiosi mentre LM17 per gli streptococchi, LM17 con cicloesimide per i lattococchi, KAA per gli enterococchi, MSE per *Leuconostoc*, FH medium per lattobacilli mesofili e MRS per lattobacilli termofili (Giraffa 2004) La coltivazione nei diversi medium ha lo scopo di selezionare diversi gruppi di batteri in base a varie caratteristiche che possono presentare: diversa tolleranza all'ossigeno, diverse esigenze nutrizionali, diversa suscettibilità agli antibiotici, diversa morfologia delle colonie, diverso colore, diverse temperature e diversi tempi di incubazione e diversi pH. L'isolamento delle colonie da questi terreni, l'impiego di test di crescita in particolari situazioni, la determinazioni di specifiche attività metaboliche, permettono di assegnare un microrganismo ad una determinata specie. L'analisi al microscopio permette di ottenere una classificazione morfologica preliminare basata sulla forma, mobilità, reazione alla colorazione di Gram, presenza di spore e formazione di catene o strutture a palizzata. Queste analisi dicono poco in relazione alla presenza di batteri appartenenti ad altre specie e dicono poco anche sulla vitalità. Per valutare la presenza\assenza di determinati batteri sono spesso necessari terreni di arricchimento per recuperare tutte le cellule batteriche, comprese quelle maggiormente stressate. (Mucchetti 2006, Giraffa 2004) L'enumerazione dei microrganismi presenti nei campioni da analizzare viene generalmente eseguita mediante i metodi di conta su piastra o del MPN (*most probable number*). La conta su piastra risulta il metodo ufficiale e di riferimento e si basa sulla corretta preparazione e diluizione del campione e permette di discriminare tra i batteri vivi e quelli che non sono in grado di moltiplicarsi. I limiti delle metodiche tradizionali sono dovuti al fatto che la precisione non è sempre soddisfacente, ci sono lunghe attese per ottenere i risultati (24 ore per i coliformi, una settimana per i batteri propionici) e non danno indicazioni sullo stato fisiologico e metabolico in quanto è possibile evidenziare solo le cellule vive senza conoscere il loro stato di attività. Nei decenni passati c'è stata un'automazione delle

metodiche tradizionali (es. *Spiral system*) e a metodi alternativi di conta (es. epifluorescenza, citofluorimetria a flusso) (Giraffa 2004).

1.6.2 Metodiche alternative e/o nuove

La continua informatizzazione e automazione degli strumenti di analisi ha avuto ripercussioni sulla microbiologia degli alimenti. Inoltre l'avvento della biologia molecolare ha rappresentato una sorta di rivoluzione in quanto ha introdotto dei metodi sempre più conoscitivi e discriminanti fondati sull'indagine di porzioni di genoma batterico (Siezen et al., 2004). Oltre all'analisi di RNA\DNA, metodiche alternative a quelle “tradizionali classiche” sono quelle di riconoscimento immunologico, quelle basate sull'analisi di profili elettroforetici delle proteine totali o delle proteine della parete oppure di enzimi, FISH (*fluorescence in situ hybridization*), analisi di marcatori chemotassonomici, test di resistenza agli antibiotici e test biochimici miniaturizzati. Sono possibili poi analisi di tipo “indiretto” che si basano sulla stima dei batteri in base alla presenza di particolari componenti e metaboliti prodotti dai batteri. Queste nuove metodiche non sono ancora state ufficializzate e spesso l'ufficializzazione rimane un problema in quanto per ottenerla è necessario un confronto tra metodi ma spesso è difficile tradurre dei segnali in un numero assimilabile a CFU (unità formanti colonia) e inoltre la sensibilità, la precisione e l'accuratezza di alcuni metodi innovativi potrebbero risultare maggiori di quelle delle metodiche ufficiali tradizionali. Per aumentare la sensibilità delle metodiche tradizionali e ridurre i tempi dedicati alla coltura di arricchimento si possono utilizzare test immunomagnetici (Mucchetti 2006).

1.6.2.1 Metodiche molecolari

Lo sviluppo esponenziale delle metodiche molecolari per l'analisi di DNA\ RNA e l'impatto della bioinformatica hanno rivoluzionato la diagnostica microbiologica e hanno permesso una migliore comprensione della diversità microbica e dei rapporti filogenetici (Siezen et al, 2004) . Queste metodiche possono essere affiancate o meno ai

metodi classici e vengono impiegate per l'identificazione\biotipizzazione di particolari specie nell'ambito della tassonomia microbica, nell'individuazione dei punti di contaminazione, nell'identificazione di patogeni in prodotti sospetti, e nell'analisi di intere comunità microbiche per l'identificazione della flora caratteristica di alcuni prodotti. L'analisi dell'RNA è molto importante nel campo della microbiologia degli alimenti in quanto permette di discriminare le specie vitali al momento del campionamento (Abee et al., 2004).

All'inizio degli anni '80 iniziarono a diffondersi l'uso di sonde a DNA per riconoscere patogeni negli alimenti (Fitts et al, 1983). Da allora sono stati messi a punto numerosi sistemi. Le sonde a PNA (acido peptidico-nucleici) sono molecole sintetiche che simulano la struttura del DNA, lo scheletro zucchero-fosfato carico negativamente è sostituito da monomeri a base di N-aminoetilglicina. Le metodiche molecolari maggiormente usate sono quelle che studiano i polimorfismi di restrizione del DNA ribosomiale (*ryboting*) o totale (*Pulse-Field Gel Electrophoresis*, PFGE). La PFGE è un *fingerprinting* esclusivo di un singolo ceppo ma i costi sono elevati, i tempi lunghi, è un metodo laborioso e c'è la necessità di colture pure. Nel *Ribotyping* si utilizzano acidi nucleici come sonde per riconoscere i geni ribosomiali. In tale tecnica, il DNA cromosomico batterico viene isolato e digerito con un enzima di restrizione. Dopo aver creato un *pattern* di restrizione, questo viene sottoposto a *southern-blot* con sonde universali ad rRNA che hanno come *target*, specifici domini conservati dell'RNA ribosomiale quali il 16S o 23S rRNA. Si vengono quindi a generare dei pattern di bande che permettono di valutare la variabilità di diversi isolati batterici, sia a livello di specie che di sottospecie (Mohania et al., 2008).

1.6.2.1.1 Metodiche molecolari che sfruttano la PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le metodiche basate sul DNA impiegano la PCR cioè l'amplificazione di marcatori genetici. La PCR è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere

amplificata in vitro. Descritta per la prima volta nel 1985 da K.B. Mullis, è stata adottata come strumento essenziale di ricerca, perché può prendere un minuscolo campione di materiale genetico e duplicarlo fino a quando non sia sufficiente per lo studio. Al DNA da amplificare vengono aggiunte delle sostanze (*primer*, dNTPs, DNA polimerasi, tampone, sali di magnesio) che innescano la reazione di polimerizzazione. I *primer* sono degli oligonucleotidi sintetici con sequenze identiche a quelle fiancheggianti la sequenza bersaglio da amplificare. Il *primer* una volta legato ad uno stampo di DNA a filamento singolo, può agire da sito di inizio per la crescita di una catena sull'estremità 3'. La scelta dei *primer* da utilizzare costituisce un aspetto essenziale per la buona riuscita della PCR. Essi, infatti, devono potersi ibridare in maniera specifica ed efficiente alla sequenza d'interesse, tralasciando quelle aspecifiche. Devono restare in eccesso per tutta la reazione di sintesi del DNA. Hanno una lunghezza, in genere, compresa tra le 20 e le 30 paia di basi e il loro contenuto in GC è intorno al 50-60%. Non dovrebbero presentare strutture secondarie né complementarità tra le loro estremità 3'. Non dovrebbero avere sequenze palindromiche al loro interno o sequenze che potrebbero autoriconoscersi formando dei *loop* che non permetterebbero più al *primer* di collocarsi sul DNA bersaglio. Ogni *primer* è caratterizzato da una specifica temperatura di *Melting* che è quella temperatura sufficiente a tenere separate il 50% delle molecole. I *primer forward* e *reverse*, che costituiscono la coppia di *primer* utilizzata per l'amplificazione di una determinata sequenza, dovrebbero avere temperature di *Melting* simili tra loro. Non dovrebbero poi esserci sequenze omologhe tra i *primer* di una stessa reazione di amplificazione perché questo potrebbe portare alla formazione di dimeri di *primer*. Per quanto riguarda la DNA polimerasi generalmente si usa la *Taq* Polimerasi. Si tratta di un enzima termostabile che replica il DNA in modo ottimale a 72°C. Essendo un enzima stabile ad alte temperature può essere sottoposto a ripetuti cicli di denaturazione (a 94°C) senza perdere la propria attività quando la

temperatura si riabbassa. Catalizza la polimerizzazione dei nucleotidi in direzione 5'→3' in presenza di Mg²⁺ ed ha un'attività 5'→3' esonucleasica (*proof reading*). Lo ione Mg²⁺ è necessario per l'attività della *Taq* polimerasi e quindi la sua concentrazione è un fattore cruciale. Il tampone di reazione è necessario per fornire un ambiente a pH e forza ionica ottimale per la reazione. L'amplificazione dei filamenti si ottiene grazie alla ripetizione di cicli secondo un profilo termico che prevede tre stadi:

Denaturazione: la soluzione di DNA viene portata ad una temperatura compresa tra 94 e 99 °C e i filamenti di DNA si separano.

Annealing: 40-60 °C circa al fine di permettere l'appaiamento dei *primer* alle loro regioni complementari nei filamenti di DNA denaturati.

Estensione: la temperatura viene alzata fino a 65-72 °C al fine di massimizzare l'azione della DNA polimerasi che, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA, determina l'allungamento dei *primer* legati. In questa fase si ha la formazione dei nuovi filamenti di DNA.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-30 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau* per carenza di *primer* o per diminuzione dei dNTPs (Dale 2004).

La PCR può essere usata come metodo di identificazione (es. PCR specie-specifica) o di tipizzazione (es. MLST, *multi-locus-sequence-types*). Attualmente il MLST è stato applicato per la tipizzazione di *Lactococcus casei*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus* (Bilhere et al., 2009; Cai et al. 2007; Calmin et al., 2008; De Las Rivas et al., 2006). Una precisa caratterizzazione è importante perché potrebbe portare all'identificazione di ceppi con particolari caratteristiche tecnologiche. Altre metodiche che sfruttano la PCR applicate allo studio dei batteri lattici sono: ARDRA, *amplified ribosomal DNA restriction analysis*

(Andrighetto et al, 1998), la RAPD, *randomly amplified polymorphic DNA* (Klein et al, 1998) e i polimorfismi di amplificazione dello spaziatore 16S-23S rRNA (Moschetti et al, 1998). La RAPD è probabilmente la più usata per la biotipizzazione dei ceppi. Un solo *primer* con poche basi in condizioni di bassa stringenza, appaia con sufficiente affinità sequenze di DNA cromosomico. Si otterrà una corsa elettroforetica caratteristica del ceppo. Questa tecnica è caratterizzata da estrema semplicità di realizzazione, costi contenuti e rapidità. Si creano gruppi, cluster, sono necessari database e questo permette una rapida identificazione degli isolati ignoti. Questa tecnica non può essere applicata per l'analisi di colture miste (Poznanski et al., 2004). Per l'elevato grado di polimorfismo interspecifico la sequenza intergenica 16S-23S rRNA può essere considerata un buon *target* potenziale per saggi rapidi molecolari selettivi specie-specifici e un valido strumento per studiare le comunità microbiche senza colture. Per stabilire i rapporti filogenetici si sfrutta il sequenziamento di specifiche zone del DNA, si utilizza il gene 16S rRNA (o frammenti di esso) o altri geni metabolici meno conservati. Il 16S rRNA è un gene lungo circa 1542 nt, che codifica per la subunità piccola del ribosoma procariota. Deve assumere una determinata struttura tridimensionale per assolvere la sua funzione, quindi ha un basso tasso di mutazione (la maggior parte delle mutazioni producono ribosomi non funzionanti e non vengono trasmesse alle progenie). Nella sequenza del gene 16S rRNA si riconoscono diverse regioni: regioni conservate universali che hanno la stessa sequenza in tutti i batteri, regioni semiconservate che hanno sequenza uguale tra batteri appartenenti allo stesso *taxon* e sequenze variabili che hanno la stessa sequenza tra batteri appartenenti alla stessa specie. Confrontando la sequenza di questo gene di diversi batteri è possibile quantificare la distanza filogenetica e cioè determinare a che punto dell'evoluzione due batteri si sono differenziati, determinare la diversità tra gli organismi e identificare un batterio: se 2 organismi hanno 16S rRNA con più del 97% delle basi omologhe

appartengono alla stessa specie Tuttavia l'analisi delle sequenze del 16S rRNA ha delle limitazioni: gli approcci basati esclusivamente sulle sequenze del gene 16S rRNA possono, in alcuni casi, essere insufficienti per arrivare alla determinazione della specie o per classificazioni intraspecifiche di sottospecie o di ceppi (Rainey et al., 1994).

In generale per l'identificazione di specie e sottospecie si analizzano zone conservate del genoma, mentre per lo studio della biodiversità all'interno della specie si studia la variabilità di sequenza in zone che codificano per particolari attività metaboliche quali geni deputati alla fermentazione, resistenza fagica, attitudine alla proteolisi e alla produzione delle batteriocine (Mohania et al., 2008).

1.6.2.1.2 Real-timePCR

La PCR quantitativa (qPCR, RT-PCR o *real-time*PCR) è usata nel campo dell'ecologia microbica per quantificare l'abbondanza e l'espressione di geni *marker* tassonomici e funzionali presenti nell'ambiente. Le analisi che si basano sulla qPCR combinano il sistema PCR *end-point* tradizionale con tecnologie di rilevamento della fluorescenza per registrare l'accumulo degli ampliconi in tempo reale durante ogni ciclo di amplificazione di PCR. La specificità del *target* di ciascun saggio è determinata dal disegno di *primer* (e in alcuni casi da una sonda) e questo permette la quantificazione di marcatori genetici tassonomici o funzionali presenti all'interno di una comunità mista. La qPCR è una metodica altamente riproducibile, robusta e sensibile per seguire a livello quantitativo i cambiamenti filogenetici e i geni funzionali nel tempo e nello spazio in condizioni di variabilità sperimentale o ambientale. I dati quantitativi generati possono essere usati per correlare la variabilità nell'abbondanza genica e/o i livelli di espressione genica (in termini di numero di trascritti) in relazione con la variazione dei fattori abiotici o biotici e/o attività biologiche. La quantificazione del numero delle copie geniche (o del trascritto) avviene durante la fase esponenziale dell'amplificazione PCR quando il numero degli ampliconi rilevati è direttamente proporzionale al numero

iniziale di sequenze *target* presenti nell'ambiente. Questo evita i problemi che si riscontrano con le *end-point*PCR dove gli ampliconi sono analizzati solo dopo il completamento del ciclo finale. Prima dello sviluppo dei metodi di *real-time*PCR basati sulla fluorescenza due metodi alternativi di PCR venivano usati per la quantificazione del numero di geni chiamate “*competitive PCR*” e “*limiting dilution PCR*”\“*most probable number PCR*”. La *real-time*PCR lavora essenzialmente come una normale *end-point* PCR: il DNA è inizialmente denaturato, segue l'*annealing* dei *primer* che si legano a specifiche sequenze e l'estensione del filamento complementare a partire da ciascun *primer* grazie ad una DNA polimerasi termostabile. C'è un aumento esponenziale del numero di ampliconi durante la PCR, tuttavia, a differenza della *end-point* PCR l'aumento del numero degli ampliconi è registrato in tempo reale attraverso il rilevamento di un reporter che indica l'accumulo dell'amplificato durante ogni ciclo. Due sistemi sono comunemente usati, l'intercalante SYBR*green* o un sistema che sfrutta delle sonde oligonucleotidiche (es.*Taqman*). Il SYBR*green* si lega alla doppia elica del DNA ed un segnale fluorescente è emesso dopo un'eccitazione luminosa. All'aumentare del numero di ampliconi dopo ogni ciclo corrisponde un aumento di fluorescenza. Poichè il SYBR*green* si lega a tutte le doppie eliche è necessario utilizzare *primer* altamente specifici per la loro sequenza *target* per evitare la formazione di prodotti aspecifici che potrebbero contribuire al segnale di fluorescenza, portando ad una sovrastima. È importante prevenire dimeri di *primer*, perciò *primer* che sono in grado di autoriconoscersi dovrebbero essere evitati. Una dissociazione post-PCR (analisi della *Melting curve*) deve essere effettuata per confermare che il segnale di fluorescenza è generato solo da templati *target* e non dalla formazione di prodotti specifici di PCR. Si tratta di una reazione nella quale la temperatura viene aumentata gradualmente e, in funzione di essa, viene misurato il decremento di fluorescenza emessa dal colorante, proporzionale all'aumentare della denaturazione del DNA. Con l'aumentare della

temperatura infatti, il doppio filamento si apre e il colorante si separa da esso, determinando la caduta dell'emissione di fluorescenza. In questo modo è possibile individuare la presenza di prodotti indesiderati in base alla diversa temperatura di *Melting* (T_m), ovvero la temperatura necessaria affinché il 50% degli ampliconi sia ridotto a singolo filamento, in corrispondenza della quale nella curva si registrerà un picco. Poiché ogni sequenza di DNA ha una T_m peculiare, dovuta alla sua lunghezza e composizione in GC, l'eventuale presenza di aspecifici viene immediatamente segnalata dalla presenza di un secondo picco. Le sonde *Taqman* sono marcate con un fluoroforo all'estremità 5' e contiene una molecola *quencher* all'estremità 3'. La vicinanza sulla sonda del *quencher* al fluoroforo blocca l'emissione di fluorescenza. Durante l'estensione del templato, l'attività esonucleasica al 5' della *Taq* stacca il fluoroforo dalla sonda *Taq* e il segnale di fluorescenza è rilevato quando il fluoroforo non è più nelle vicinanze del *quencher*. L'amplificazione del templato è così rilevata dal rilascio e accumulo del fluoroforo durante la fase di estensione di ogni ciclo di PCR. L'ulteriore specificità data dalla sonda assicura che la fluorescenza è data solo dall'amplificazione della sequenza *target*. Queste sonde sono però costose rispetto all'uso della chimica *SYBRgreen* e richiedono un'ulteriore sito conservato all'interno della corta sequenza dell'amplicone. Le sonde MGB (*minor groove binding*) sono uno sviluppo delle sonde *Taqman*. La molecola MGB (es. il peptide diidrociclopirroloindolo-tripeptide) è attaccata all'estremità 3' e si ripiega sulla sonda. Questo aumenta la stabilità della sonda e permette il disegno di sonde più piccole (13-20 bp) rispetto a quelle tradizionali richieste per le sonde *Taqman* (20-40 bp). Esistono anche altri tipi di chimiche di rilevazione, come le sonde di ibridazione con struttura secondaria. L'andamento della reazione di *real-time* PCR presenta quattro fasi: una fase iniziale chiamata (*background noise*), una fase esponenziale (*log phase*) e una fase lineare e una fase finale di *plateau*. La *lag phase* termina nel momento in cui il segnale di fluorescenza dell'amplificazione

risulta maggiore del segnale di fondo (*background*), generato dalla chimica di rivelazione utilizzata. La fase esponenziale inizia quando è stata accumulata una quantità di prodotto tale da superare il segnale di fondo e finisce nel momento in cui l'efficienza di reazione si riduce, determinando la perdita di linearità dell'amplificazione e l'entrata della reazione nella fase di *plateau*. Durante i primi cicli, di PCR, le emissioni di fluorescenza generano un segnale troppo debole per distinguersi dal segnale di fondo; In questa fase viene determinata la cosiddetta "*baseline*"; quando il segnale di fluorescenza supera una determinata soglia detta (*threshold*) può essere determinato in sua corrispondenza il ciclo-soglia (*cycle threshold*, Ct nella letteratura dell'*Applied Biosystems* o *crossing-point*, Cp, secondo la letteratura per la strumentazione Roche, *LightCycler*). La tecnica della *real-time* PCR permettere di compiere sia dei saggi di tipo qualitativo (presenza- assenza) sia dei saggi di tipo quantitativo. Un saggio quantitativo misura quantitativamente l'ammontare di un acido nucleico *target* durante ogni ciclo di amplificazione della PCR. Il *target* può essere DNA, o cDNA. La quantificazione può essere assoluta o relativa. Una quantificazione assoluta è utilizzata per quantificare un campione contenente una quantità incognita di DNA *target* tramite l'interpolazione della sua quantità con una curva standard a titolo noto. La quantità assoluta degli standard deve essere determinata preventivamente attraverso dei metodi indipendenti. La quantificazione assoluta consente quindi di definire il numero esatto di molecole del gene *target* presente in un campione, di solito mettendo in relazione il segnale di fluorescenza di tale *target* a concentrazione non nota con la curva standard di un campione a concentrazione nota. La quantificazione relativa solitamente è impiegata per analizzare i cambiamenti nell'espressione genica di un dato campione (*target*), relativamente a un campione di riferimento. Si sceglie un *reference*, cioè un gene di riferimento, che permetta di normalizzare i risultati sperimentali dei geni *target*. I *reference* sono geni *housekeeping* e dovrebbero essere idealmente espressi

in modo ubiquitario, avere elevati e costanti livelli di espressione e non esseri sottoposti a regolazione trascrizionale. E' più difficile applicare questo metodo allo studio di geni procariotici perchè l'identificazione di geni in una condizione stabile è difficile. (Burgmann et al., 2007) hanno identificato un gene, dai risultati di esperimenti in *microarray* (*Silicibacter pomeroyi* con dimetilesolfoniopropionato) la cui espressione non veniva alterata dalle condizioni sperimentali e hanno usato l'espressione di questo gene per normalizzare i livelli di espressione di geni *target* in *real-time*PCR. In altri studi il numero di geni e trascritti del gene *target* di interesse è stato normalizzato sul numero di geni o trascritti 16S rRNA. Questo approccio è controverso, specialmente quando si amplificano geni e trascritti amplificati da acidi nucleici estratti da matrici complesse. Questo perchè il numero di trascritti e di copie di geni 16S rRNA sono altamente variabili, con il numero di geni 16S rRNA che varia tra le specie da 1 a 15 volte. In certi situazioni complesse, dove popolazioni con più specie all'interno sono campionate con impurità o dove i batteri sono internalizzati in particolari matrici, altre metodiche risulterebbero meno sensibili e precise dell'uso del 16S rRNA in *real-time*PCR (Klappenbach et al., 2000). Per la normalizzazione tra diversi esperimenti si impiega un campione calibratore. Nella quantificazione assoluta il numero di geni *target* o di trascritti sono determinati da una curva standard generata dall'amplificazione del gene *target* presente in un range di concentrazioni per ciascuna delle quali il valore di Ct è determinato. La curva standard è ottenuta riportando in ordinata i valori di Ct ottenuti dopo amplificazione e in ascissa il logaritmo delle concentrazioni iniziali, generalmente 4 o 5. Se la reazione ha una buona efficienza i valori di Ct e le concentrazioni iniziali del campione sono legati da una relazione lineare. La curva che fornisce la migliore interpolazione dei punti del grafico è una retta con una pendenza ideale (*slope*) di -3,322, a cui corrisponde un'efficienza della reazione del 100%. Sono importante anche i valori di R^2 cioè il coefficiente di regressione lineare e il valore dell'intercetta (Ririe et

al., 1997; Kubista et al., 2006). La PCR quantitativa può essere usata per rilevare e quantificare sia l'RNA che il DNA batterico, tuttavia è stata applicata maggiormente per quantificazioni di DNA piuttosto che in studi di espressione genica. Questo è dovuto maggiormente alle difficoltà nell'estrazione dell'RNA in ecosistemi complessi come gli alimenti. Per misurare i livelli di espressione genica si può utilizzare anche la metodica dei *microarray* con cui si possono studiare contemporaneamente un grandissimo numero di geni. Oltre che misurare l'espressione genica, i *microarray* (ad es. *PhyloChip*) possono essere usati anche per lo screening simultaneo di diverse comunità microbiche all'interno di diversi ambienti per la presenza di specifici ribo\filotipi (*taxa*) (Giraffa et al., 2004; Zago et al., 2009; Mohania et al., 2008).

1.6.3 Analisi delle comunità microbiche

La microflora autoctona dei formaggi rappresenta un patrimonio che deve essere protetto e conservato (Marino et al., 2003). Studiare la biodiversità dei batteri lattici implicati nella produzione di un particolare formaggio è importante per capire il ruolo di questi microrganismi nel processo tecnologico e per trovare criteri per selezionare particolari ceppi starter (Delbes et al. 2007, Martin-Platero 2008). Misurare la diversità microbica interspecifica significa valutare la “*species richness*” (numero degli organismi appartenenti ai diversi *taxa*) e la “*specie evenness*” (distribuzione all'interno dei *taxa*) (Kirk et al., 2004). Tra il 2001 e il 2006, con un Progetto finalizzato MiPAF “Valorizzazione e salvaguardia della microflora lattica autoctona presente in formaggi tradizionali italiani”, si è cercato di proteggere e valorizzare la microflora naturale in prodotti lattiero-caseari tipici (MiPAF, 2006). In questo progetto sono stati coinvolti enti pubblici e varie Università italiane e sono stati caratterizzati 44 formaggi tipici (principalmente a latte crudo) di latti di specie diverse e provenienti da 18 regioni.

Reference	Tipologia prodotto	Metodiche utilizzate
Aquilanti et al. 2007	Pecorino Marchigiano	RAPD sequenziamento 16S rRNA
Poznanski et al. 2004	Formaggi tradizionali a latte crudo	RAPD sequenziamento 16S rRNA
Gardini et al. 2006	Pecorino Siciliano e Ragusano	antibiotico resistenza, emolisi, ammine biogene
Marino et al. 2003	Montasio	metodiche colturali classiche

Tabella 1: Esempi di studi di comunità microbiche in formaggi italiani

1.6.3.1 Metodiche coltura-dipendenti

Per metodi coltura-dipendenti si intendono metodi colturali tradizionali in combinazione con analisi fenotipiche (fisiologiche e biochimiche) e genotipiche (PCR specie-specifica o RAPD) necessarie per la corretta identificazione e tipizzazione. I metodi di coltura di solito arrivano solo a definire gruppi\generi e raramente la loro sensibilità arriva a descrivere correttamente la specie. Quindi l'isolamento delle colonie dalla piastra e la loro identificazione\tipizzazione biochimica e/o molecolare sono necessari per aumentare la sensibilità delle analisi (Giraffa 2004; Jany et al., 2008; Nocker et al., 2006). Questi sistemi di indagine mostrano dei limiti dovuti soprattutto al problema della non coltivabilità di alcuni microrganismi con le metodiche colturali classiche. Talvolta in ecosistemi microbici complessi la capacità di alcuni batteri con deficit metabolici a moltiplicarsi in un alimento può essere stimolata dalla presenza e dall'interazione con altri microrganismi che sono in grado di supplire a questi loro *deficit* (Nadkarni et al., 2009). I terreni di coltura permettendo tipicamente la crescita solo di una piccola frazione di microrganismi, non sono in grado di riprodurre le nicchie ecologiche e le interazioni simbiotiche presenti in ambienti naturali complessi. A parte il fatto della selezione che permette la crescita solo di alcune specie sopprimendo la crescita di altre, la composizione della comunità della frazione colturabile è distorta durante la semina perché i tempi di replicazione variano e le specie che crescono efficientemente mandano fuori competizione le altre. Inoltre la maggior parte dei terreni di coltura sono fonti estremamente ricche di carbonio rispetto ai substrati che si ritrovano normalmente in situ, e questo potrebbe influenzare la composizione della comunità microbica coltivata verso copiotrofi (microorganismi che crescono in presenza di elevati livelli di fattori nutritivi)(Nocker et al. 2006).

1.6.3.2 Metodiche coltura-indipendenti

L'ecologia microbica ha visto grandi cambiamenti negli ultimi vent'anni per quanto riguarda i metodi impiegati nell'analisi delle comunità microbiche. La differenza tra la diversità che emerge utilizzando i metodi coltura classici e la reale diversità *in situ* ha aumentato l'importanza di un approccio molecolare coltura-indipendente. Inizialmente questa transizione è stata compiuta analizzando profili di acidi grassi ma recentemente il DNA è diventato la molecola principalmente studiata. Alla fine degli anni '90 gli approcci di tipo molecolare hanno aperto delle nuove frontiere nello studio dell'ecologia microbica (Abee et al., 2004). Questi metodi, definiti come coltura-indipendenti, sono caratterizzati dal fatto che i microrganismi non vengono più coltivati ed isolati, ma si rilevano direttamente all'interno del campione attraverso l'analisi del loro DNA ed RNA. La principale novità di questi procedimenti è l'estrazione diretta degli acidi nucleici dalle matrici in esame, i quali, successivamente, vengono analizzati con strumenti molecolari in grado di definire la loro diversità, la quale è in stretta connessione con la complessità microbica del sistema in studio (Giraffa et al., 2001). Studiando il DNA si può definire quante e quali specie microbiche sono presenti in un determinato campione, mentre analizzando l'RNA si è in grado di comprendere quali sono le specie metabolicamente attive (Coppola et al., 2003). Queste metodiche si basano sia sul clonaggio e sequenziamento diretto dei frammenti di DNA o spesso sull'amplificazione di sequenze *target* utilizzando la PCR. Nel secondo caso il pool dei prodotti di PCR può essere clonato e sequenziato oppure gli ampliconi possono essere soggetti a varie tecniche di “*genetic profiling*” (Nocker et al., 2007). Anche la *real-time*PCR può essere applicata allo studio delle comunità microbiche, si tratta di un metodo sensibile e accurato che permette l'identificazione di specie individuali o gruppi batterici in ecosistemi complessi (Collado et al. 2009). Le metodiche coltura-indipendenti su cui si basano gli studi di ecologia microbica sono: *denaturing gradient*

gel electrophoresis (DGGE), *temperature gradient gel electrophoresis* (TGGE), *single strand conformation polymorphism* (SSCP), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *terminal restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP), *automated ribosomal intergenic spacer analysis* (ARISA), clonaggio e sequenziamento di librerie 16S rRNA. Con la tecnica che utilizza l'elettroforesi su gel in condizioni denaturanti (DGGE) o (TGGE), possono essere separati frammenti di DNA a doppio filamento, di stessa lunghezza, ma diversa sequenza. Il *fingerprinting* si ottiene per effetto del diverso comportamento di denaturazione delle molecole in un gradiente lineare di denaturazione ottenuto mediante agenti chimici (urea e formamide) o fisici (temperatura). Nel caso della PCR-DGGE, gli acidi nucleici sono sottoposti ad amplificazione genica mediante l'utilizzo di *primer* universali, i quali sono in grado di amplificare, teoricamente, tutto il DNA, o RNA, di determinati gruppi microbici, come i batteri o i lieviti. In seguito ad amplificazione, si otterranno delle miscele di molecole di DNA che saranno tanto più complesse quanto più elevata è la biodiversità microbica nel sistema studiato. Esse, dato che provengono da microrganismi diversi, saranno caratterizzate da sequenze nucleotidiche differenti, le quali vengono sfruttate per separare le molecole di DNA prodotte durante la PCR. Quando le molecole di DNA incontrano il gradiente di denaturante che determina un'apertura della doppia elica, queste rallentano la migrazione elettroforetica fino a fermarsi completamente in una posizione specifica del gel. Dato che la denaturazione del DNA avviene in funzione della sequenza nucleotidica (contenuto in G+C e distribuzione delle basi), molecole con sequenze diverse avranno delle migrazioni elettroforetiche diverse. Con questo approccio si possono quindi separare microrganismi presenti nello stesso ecosistema, purché presentino delle sequenze nucleotidiche amplificate diverse. I primi studi in cui è stata applicata la PCR-DGGE hanno riguardato la microbiologia ambientale (Muyzer et al, 1998) e solo all'inizio degli anni 2000 si è vista una grossa espansione di questa tecnica nell'ambito

della microbiologia enologica ed alimentare in generale. Studi di ecologia microbica di prodotti carnei (Cocolin et al., 2004; Rantsiou et al., 2005), di prodotti lattiero caseari (Ercolini et al., 2001; Randazzo et al., 2002), impasti acidi (Meroth et al., 2003) e di vegetali (Perez Pulido et al., 2005) hanno contribuito a comprendere meglio il ruolo di specifici microrganismi nelle fermentazioni alimentari. La SSCP permette la separazione dei prodotti di PCR di lunghezza simile ma con diversa sequenza. A differenza delle metodiche DGGE e TGGE si basa non sulla separazione di un doppio filamento di DNA bensì di un singolo filamento di DNA. La separazione dei filamenti avviene in condizioni denaturanti prima del caricamento nel gel di acrilammide non denaturante. In condizioni non denaturanti il singolo filamento assume una struttura secondaria ripiegata. Diverse conformazioni producono diversi comportamenti di migrazione nel gel e questo permette di separare il DNA da complesse comunità microbiche. Come per il DGGE e TGGE le bande individuali di interesse possono essere isolate e sequenziate dopo l'estrazione dal gel di acrilammide. Il singolo filamento deve poi essere riamplicato e clonato in un vettore. Un limite di questa tecnica è l'elevato tasso di *re-annealing* del singolo filamento durante la migrazione. Questo potrebbe essere critico quando si caricano elevate concentrazioni di DNA e potrebbe essere richiesto quando si analizzano comunità con una elevata diversità al loro interno. Il fatto quindi che una specie possa essere rappresentata da più picchi complica l'interpretazione dei risultati (Liu et al., 1997). Per quanto riguarda la creazione di librerie geniche dopo il clonaggio degli amplificati 16S rRNA in vettori il sequenziamento degli inserti è il metodo che offre la risoluzione filogenetica più elevata. Il *Ribosomal Database Project* (RDP) contiene 1,281,097 (Dicembre 2009) sequenze geniche 16S rRNA. L'automazione delle tecniche ha permesso il sequenziamento diretto dei cloni senza uno screening iniziale anche nel caso di comunità altamente ridondanti (come nel caso degli ambienti naturali). Lo screening

(es. applicando la metodica ARDRA) può servire a limitare il sequenziamento ad un numero selezionato di OTU (*operational taxonomic units*) e viene usato quando un grande numero di cloni deve essere sequenziato per rilevare microrganismi rari in un *background* di poche specie dominanti. Per questo motivo fino a poco tempo fa era possibile ottenere informazioni dettagliate sulle sequenze solo per un numero limitato di campioni per via della mole di lavoro e dei costi di questo tipo di approccio (Delbes et al., 2007). Un'alternativa al sequenziamento di specifici geni conservati è il sequenziamento di DNA di comunità batteriche clonate con la metodica “*whole-genome shotgun cloning*”. I templati da sequenziare sono piccoli pezzi di DNA genomico prodotti dalla frammentazione fisica. I progressi nella tecnologia di sequenziamento incoraggiano sempre più gli sforzi nello studio dei genomi del microbiota totale di uno specifico ambiente (Metagenoma) (Riesenfeld et al., 2004). Un passo rivoluzionario è stato fatto da Venter con il sequenziamento dell'intero metagenoma del Mar di Sargasso (Venter et al., 2004). L'interpretazione della ricchezza genomica risultante si basa su potenti strumenti bioinformatici. La metodica *amplified ribosomal DNA restriction analysis* ARDRA o *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) del gene 16S rRNA si basa sulla digestione con enzimi di restrizione dei prodotti di PCR seguita dalla separazione elettroforetica dei frammenti in agarosio ad elevata percentuale o in gel di acrilammide. Siccome un singolo enzima non offre una risoluzione genotipica sufficiente (specie diverse possono avere lo stesso *pattern*) possono essere usati più endonucleasi sia da sole che in combinazione. I prodotti di PCR sono sia processati come *pool* sia clonati per ottenere una separazione di sequenze individuali per ulteriori analisi. In generale questa metodica è utile per determinare cambiamenti in comunità microbiche relativamente semplici, ma non è il metodo di scelta per misurare la diversità o rilevare specifici gruppi filogenetici (Nocker et al., 2006). Le regioni ITS (*intergenic transcribed spacer*) sono localizzate tra i geni

ribosomali 16S rRNA e 23S rRNA e mostrano eterogeneità significativamente più elevata sia in lunghezza che nella sequenza nucleotidica rispetto alle regioni fiancheggianti. Entrambe questi tipi di variazioni li rendono adatti per la tipizzazione batterica dei ceppi e di specie strettamente connesse quando il *fingerprinting* delle sequenze dei geni ribosomali non offre una sufficiente risoluzione. La metodica ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*) si basa sulla variazione delle taglie degli ampliconi specie-specifici. I potenziali problemi sono la possibile amplificazione preferenziale dei templati più corti e il fatto che poiché sono possibili variazioni della lunghezza interoperonica all'intero di un singolo genoma, un singolo microrganismo potrebbe contribuire a più di un segnale (Jensen et al., 1993). In aggiunta alla determinazione della lunghezza degli ITS, le regioni ITS possono essere soggette all'analisi RFLP e/o al sequenziamento. Entrambe le tecniche sono state applicate per distinguere con elevata risoluzione diversi ceppi di *Pseudomonas stutzeri*. Nella *denaturing high-performance liquid chromatography* (DHPLC) un mix eterogeneo di prodotti di PCR 16S rRNA viene separato usando la tecnologia HPLC (*high-performance liquid chromatography*) (Nocker et al., 2006). L'analisi T-RFLP misura la grandezza del polimorfismo dei frammenti terminali di restrizione di un *marker* genetico amplificato mediante PCR. I *primer* possono essere marcati alla loro estremità 5' con una molecola fluorescente e così risultano marcati i prodotti di PCR. Se entrambi i *primer* sono marcati, sono necessari diversi fluorofori e i più comuni sono: 6-FAM, ROX, TAMRA, ed HEX. Una volta amplificati i frammenti vengono separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide o con sistemi basati sull'elettroforesi capillare con rilevamento automatico dei frammenti marcati di DNA mediante laser. Il risultato di tale analisi è un elettroferogramma costituito da una serie di picchi che differiscono per mobilità (taglia molecolare), altezza e area e che rappresentano le diverse forme microbiche presenti nella comunità in esame. L'uso di un solo *primer* potrebbe

sottostimare la diversità perché diverse popolazioni batteriche potrebbero condividere lo stesso frammento terminale, questo problema può essere ridotto usando due *primer* marcati. Di solito si usano enzimi di restrizione che riconoscono quattro basi perché in generale c'è una frequenza più alta di trovare questi siti. Si è visto che questa metodica è più efficiente quando si analizzano comunità con una ricchezza in specie bassa-intermedia e quindi non troppo complesse. La digestione *in silico* è importante per valutare l'abilità degli enzimi di restrizione a discriminare tra le diverse sequenze. Ci sono vari strumenti web come *T-RFLP analysis program* (TAP), *MiCA 16S rRNA, restriction endonuclease peaker* (REPK). Quest'ultimo determina automaticamente set di enzimi di restrizione sulla base delle sequenze FASTA che si vogliono analizzare. Anche se le analisi *in silico* rivelano la capacità dei vari enzimi di restrizione a risolvere i gruppi batterici, l'output deve essere preso in considerazione con cautela. Bisogna considerare che solo una piccola frazione della totale diversità batterica è stata descritta e i database con le sequenze del DNA batterico sono incompleti. E' importante che le combinazioni *primer*\enzima analizzate *in silico* siano valutate sperimentalmente. L'analisi dei dati non è sempre semplice, spesso può risultare difficile distinguere il segnale reale dal rumore di fondo. Il protocollo T-RFLP spesso include un “*cleanup*” dei prodotti di PCR prima della restrizione e a volte viene usato un passaggio di “*desalting*” prima della corsa al capillare. Questo metodo è stato descritto per la prima volta nel 1997 da Liu et al. amplificando il gene 16S rRNA sia da isolati batterici che da campioni ambientali. Da allora il metodo è stato applicato utilizzando anche altri marcatori genici ad esempio il gene *pmoA* per analizzare comunità metanotrofiche. Solo i frammenti terminali marcati vengono letti mentre tutti gli altri sono ignorati. In questo il T-RFLP si differenzia dalla metodica ARDRA e dall'RFLP nei quali, invece, tutti i frammenti di restrizione sono visualizzati. Questa metodica permette di monitorare i cambiamenti nella struttura della comunità microbica nel tempo e nello

spazio osservando la presenza\assenza dei vari frammenti (Liu et al., 1997). Questa metodica è ulteriormente informativa se accoppiata al clonaggio e al sequenziamento di librerie 16S rRNA (Nocker et al. 2006). Anche se con gli approcci di tipo molecolare si riescono a superare i limiti delle metodiche tradizionali, bisogna comunque considerare che talvolta anche le tecniche molecolari possono mostrare dei punti critici quali i limiti intrinseci della PCR e la dipendenza dei risultati dall'efficienza di lisi cellulare durante l'estrazione degli acidi nucleici. Per questo motivo nell'analisi di ecosistemi microbici complessi potrebbe essere interessante l'utilizzo accoppiato di entrambi gli approcci coltura dipendente ed indipendente. Delbes et al. (2007) hanno analizzato la microflora del formaggio *Saint Nectaire* sia con approcci coltura dipendenti che coltura indipendenti, quindi sia tramite estrazione diretta che utilizzando medium colturali. Utilizzando la metodica SSCP e il sequenziamento 16S rRNA sia di singoli isolati cresciuti in piastre che ottenuti con la costruzione di librerie hanno ottenuto risultati complementari.

2. OBIETTIVO

L'obiettivo generale di questo progetto di ricerca è stato quello di studiare la biodiversità microbica durante le fasi di produzione del formaggio Montasio D.O.P. attraverso un approccio che ha utilizzato metodiche molecolari coltura-indipendenti. E' stato scelto questo formaggio per permettere la messa a punto di metodi molecolari su un prodotto che fosse già stato studiato e caratterizzato con le metodiche classiche per poter confrontare i risultati ottenuti con le due diverse metodiche. Gli approcci di tipo molecolare hanno aperto delle nuove frontiere nello studio dell'ecologia microbica. Questi metodi, definiti come coltura-indipendenti, sono caratterizzati dal fatto che i microrganismi non vengono più coltivati ed isolati, ma si rilevano direttamente all'interno del campione attraverso l'analisi del loro DNA ed RNA. La principale novità di questi procedimenti è l'estrazione diretta degli acidi nucleici dalle matrici in esame, i quali, successivamente, vengono analizzati con strumenti molecolari in grado di definire la loro diversità. Studiando il DNA si può definire quante e quali specie microbiche sono presenti in un determinato campione, mentre analizzando l'RNA si è in grado di comprendere quali sono le specie attive. I saggi molecolari sono stati messi a punto dopo una fase iniziale di valutazione della qualità degli acidi nucleici estratti. C'è stata una fase di *screening* (sequenziamento di librerie di 16S rRNA e T-RFLP) per valutare le comunità microbiche presenti nelle diverse fasi di produzione e nel prodotto finito. I dati ottenuti dal sequenziamento dei cloni 16S rRNA e dal T-RFLP sono sufficienti per ottenere una visione generale della comunità microbica ma allo stesso tempo sono insufficienti per ottenere un' accurata e realistica quantificazione dei microrganismi presenti nei campioni. Usando la *real-time*PCR quantitativa su DNA e cDNA è possibile superare questi limiti di quantificazione e monitorare nel tempo le dinamiche microbiche durante le fasi di maturazione del prodotto. Sono stati quindi messi a punto cinque test in *real-time*PCR per identificare e quantificare tre specie e un genere di

batteri lattici (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Enterococcus* spp.) e un saggio specifico per *Pseudomonas* spp. L'analisi è stata eseguita utilizzando un test “target” e un test “reference” (per permettere la normalizzazione dei risultati). Sono stati quindi utilizzati dei primer universali (16S rRNA) e dei primer specie/genere specifici disegnati su sequenze di geni *housekeeping* o geni conservati implicati in funzioni base necessari al mantenimento della cellula batterica. Enterococchi spp, *Lactobacillus casei* e *Pediococcus pentosaceus* fanno parte della cosiddetta “microflora non starter” svolgono un ruolo importante nella maturazione del prodotto e di solito provengono dal latte crudo o dagli ambienti di produzione e di maturazione del formaggio. *Lactobacillus casei* ha un'elevata attività peptidasi, è in grado di metabolizzare aminoacidi con produzione di composti aromatici e allo stesso tempo possiede riconosciute proprietà probiotiche. Si è deciso di ricercare questi microrganismi di elevato interesse tecnologico sia per confrontare ed integrare i dati ottenuti dal sequenziamento dei cloni, sia per verificare l'applicabilità di metodiche quantitative rapide e relativamente poco costose (rispetto alla costruzione di librerie di cloni) che permettono il monitoraggio microbiologico durante l'intero processo produttivo. Sono stati messi inoltre a punto dei saggi in PCR *real-time* per studiare l'espressione di otto geni implicati nel sistema *quorum-sensing* in *Streptococcus thermophilus*. Questo è stato fatto per verificare l'applicabilità di studi di espressione genica su RNA batterico estratto direttamente dalla matrice formaggio con l'intenzione, in futuro, di utilizzare questa tipologia di studi per la caratterizzazione di funzioni geniche interessanti per la produzione di prodotti lattiero-caseari.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici di riferimento

Tutti i ceppi di riferimento utilizzati in questo studio sono elencati nella tabella 2. Nove di questi ceppi sono “*type collection*” e sono stati forniti dai colleghi del Dipartimento di Scienze degli Alimenti della Facoltà di Agraria dell’Università di Udine. Sei ceppi sono stati invece isolati nel nostro laboratorio da diverse matrici alimentari.

Ceppi di riferimento	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ20231
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSMZ20478
<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ20477
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DSMZ 20617
<i>Lactococcus lactis</i>	DSM20069
<i>Leuconostoc lactis</i>	CECT4173
<i>Enterococcus faecalis</i>	CECT184
<i>Escherichia coli</i>	NTCT9001
<i>Bacillus cereus</i>	Cardazzo et al. 2008
<i>Lactobacillus casei</i>	Università di Padova
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Università di Padova
<i>Listeria monocytogenes</i>	Università di Padova
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Università di Padova
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Università di Padova
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Università di Padova

Tabella 2: Ceppi batterici di riferimento usati in questo studio

3.2 Campioni di formaggio

La sperimentazione è stata condotta su campioni di formaggio prodotto presso il Caseificio di Bidino (Coseano, Udine), aderente al Consorzio per la Tutela del formaggio Montasio D.O.P. Il formaggio è stato prodotto a partire da latte termizzato (62°C per 15 minuti) di vacca in accordo con le pratiche tradizionali (Innocente et al., 1996). Latte termizzato, cagliata, formaggio a 2 e 5, 13, 30, 60, 90 e 150 giorni di maturazione sono stati campionati in duplicato. Gli stessi campioni sono stati raccolti e sottoposti ad analisi microbiologiche presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti della Facoltà di Agraria dell'Università di Udine.

3.3 Estrazione del DNA

Il DNA dei ceppi di riferimento è stato estratto usando il *Spin Tissue Mini Kit Invisorb* (Invitek, Berlin, Germany) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Per i campioni di Montasio il *kit Invisorb* è stato usato con le seguenti modifiche: aliquote da 50 ml di latte sono state centrifugate a 4000 rpm per 20' a 4°C ed il *pellet* cellulare è stato risospeso in soluzione PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Le aliquote di cagliata e di formaggio sono state omogenizzate per 2 minuti in uno *Stomacher Lab-Blender 400* (*PBI International, Milan, Italy*) e campionate utilizzando un coltello sterile (circa 150 mg per l'estrazione di DNA e 100 mg per l'estrazione di RNA). Per l'estrazione del DNA batterico totale dopo un'incubazione di un'ora a 56°C i campioni sono stati incubati per 10' a 70°C e per 2' a 90°C. Le estrazioni sono state poi eseguite usando l'*Invisorb Tissue Mini Kit* (Berlin, Germany Invitek) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Il DNA è stato eluito in 50 µl di buffer di eluizione.

3.4 Estrazione dell'RNA

Per l'estrazione dell'RNA batterico totale si è cercato di evitare qualsiasi forma di

contaminazione da RNAsi. Il *pellet* ottenuto dal latte è stato mescolato con il Buffer RLT e con il β -mercaptoetanol. 100 mg di formaggio sono stati posti in una provetta contenente biglie di zirconio. Questa provetta è stata poi agitata vigorosamente al *RyboLyser* (40 secondi, velocità 5.5). L'RNA è stato estratto con l'*RNAeasy Mini kit* (*Qiagen, Hilden, Germany*) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il trattamento con la DNAasi è stato eseguito utilizzando il *Qiagen RNase-Free DNase Set* (*Qiagen, Hilden, Germany*). L'RNA è stato eluito in 30 μ l con H₂O *Rnase-free*. Un μ g di RNA totale per ciascun campione è stato retrotrascritto a cDNA usando la *Superscript II* (*Invitrogen*).

3.5 Valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici

Il DNA e l'RNA purificati sono stati quantificati al *NanoDrop® ND-1000* (*NanoDrop Technologies, Wilmington, DE*). Il *NanoDrop* è uno spettrofotometro ad ampio spettro (220-750 nm) in grado di quantificare, in modo accurato e riproducibile, ridotte quantità di DNA o RNA. Da ogni quantificazione ottengo 3 risultati: concentrazione di acidi nucleici in ng/ μ l (basata sull'assorbanza standard a 260 nm); rapporto di assorbanza 260/280, che è usato per accertare la purezza del DNA o RNA (un rapporto accettabile è intorno a 2): se il rapporto è troppo basso può indicare la presenza di proteine o altri contaminanti; rapporto di assorbanza 260/230, anche questo usato per accertare la purezza (un rapporto accettabile è intorno a 2): se il rapporto è troppo basso può indicare la presenza di residui di solventi.

Il DNA dei ceppi di riferimento è stato sequenziato per controllare che si trattasse realmente delle specie di interesse dichiarate. Il DNA è stato amplificato seguendo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9 (usando *primer* 16S rRNA) e successivamente sequenziato. L'identificazione delle specie batteriche è stata ottenuta tramite la comparazione con database di sequenze nucleotidiche (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Saggi in SYBR*green* qRT-PCR utilizzando i *primer* universali 16S rRNA (Nadkarni et al. 2002) sono stati eseguiti sia su campioni di RNA non retrotrascritto (per valutare l'eventuale contaminazione di DNA in campioni di RNA trattati con DNAasi) che su campioni di DNA e di cDNA (per studiare la qualità dei campioni). Per le condizioni di allestimento di questi saggi in qRT-PCR vedere paragrafo 3.12.

3.6 Analisi bioinformatiche per messa a punto T-RFLP

Sequenze del 16S rRNA di diversi batteri (LAB, patogeni e deterioranti solitamente presenti nei prodotti lattiero-caseari) sono state ottenute da Genebank e allineate con il programma ClustalW (Thompson et al., 1994). La scelta dell'enzima di restrizione e l'identificazione del sito di taglio nelle varie specie batteriche è stata ottenuta tramite lo strumento bioinformatico NEB*cutter* v.2.0.

3.7 T-RFLP su DNA ceppi di riferimento

La funzionalità e la specificità della metodica T-RFLP è stata valutata, oltre che *in silico*, anche sperimentalmente analizzando DNA di specie batteriche di riferimento (tabella 2). I DNA di cinque ceppi di riferimento sono stati amplificati con i *primer* 16S rRNA (Nadkarni et al. 2002) con il *primer reverse* marcato con il fluoroforo FAM. È stato utilizzato il seguente ciclo termico: denaturazione iniziale 2 min a 94 °C, 20 sec a 94 °C, 30 sec alla temperatura di *annealing* di 60°C e 30 sec a 72 °C in un volume finale di reazione di 20 µl. La mix di reazione contiene 2 ng/µl di DNA o cDNA, 0,2 mM di dNTP, 1× *GoTaq* buffer, 1,5 mM MgCl₂, 1 U of *GoTaq* polimerasi (*Promega Madison USA*) e 250 mM di ciascun *primer*. C'è stata una valutazione qualitativa degli amplificati ottenuti su gel di agarosio 1,8% e successivamente è stata effettuata la digestione di tali campioni utilizzando l'enzima di restrizione *MseI*. La mix per la digestione (volume finale di 6,25 µl) è stata preparata aggiungendo i seguenti reagenti:

NEB Buffer2 1X, Enzima *MseI* 1,6 u/μl, BSA 0,96X . La digestione è stata effettuata a una temperatura di 37°C per 2 ore e 30 Minuti. I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare utilizzando lo strumento *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). I risultati ottenuti dalla corsa elettroforetica al capillare sono stati analizzati utilizzando il *software Genotyper 3.7* (*Applied Biosystems*).

3.8 T-RFLP su campioni di Montasio

Questo approccio è stato scelto per cercare di individuare le specie batteriche presenti nei vari campioni DI Montasio (latte crudo, innesto, cagliata, cagliata a 2, 5, 13 giorni e formaggio a 30, 60 giorni). DNA e RNA estratti dai campioni di formaggio sono stati amplificati con i *primer* 16S rRNA (Nadkarni et al, 2002) come descritto nel paragrafo 3.7 con la sola differenza che il *primer reverse* era marcato con il fluoroforo FAM. La digestione e la corsa elettroforetica al capillare sono state eseguite come descritto nel paragrafo 3.7.

3.9 Creazione librerie di cloni 16S rRNA

Per generare librerie di cloni da sequenziare, i campioni di DNA e di cDNA sono stati amplificati con i *primer* universali 16S rRNA (Nadkarni et al. 2002) utilizzando il seguente ciclo termico: denaturazione iniziale 2 min a 94 °C, 20 sec a 94 °C, 30 sec alla temperatura di *annealing* di 60°C e 30 sec a 72 °C in un volume finale di reazione di 20 μl. La mix di reazione contiene 2 ng/μl di DNA o cDNA, 0,2 mM di dNTP, 1× *GoTaq* buffer, 1.5 mM MgCl₂, 1 U of *GoTaq* polimerasi (*Promega Madison USA*) e 250 mM di ciascun *primer*. Il prodotto di PCR è stato ligato con il *TOPO TA Cloning Kit* (*pCR2.1-TOPO vector*) e trasformato in cellule *Escherichia coli TOP10 Chemically Competent OneShot* seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

3.10 Screening dei cloni 16S rRNA e 16S rRNA con T-RFLP

Gli inserti plasmidici sono stati amplificati utilizzando una “PCR di *screening*” che prevedeva l'utilizzo di tre *primer*: T7, M13 e il 16S rRNA *reverse* marcato con FAM. I *primer* T7 e M13 si legano a sequenze sul vettore fiancheggianti l'inserto (gene 16S rRNA) che si è inserito durante la ligazione. L'amplificazione ottenuta grazie al *primer* 16S rRNA *reverse* e a uno degli altri due (in base all'orientamento dell'inserto nel vettore) permette di ottenere un amplicone marcato con FAM. La digestione con l'enzima *MseI* porta alla digestione di tutti gli ampliconi ottenuti, marcati e non marcati, ma la corsa al capillare permette di rilevare solo i frammenti marcati. L'*output* della corsa al capillare è un elettroferogramma costituito da un picco che rappresenta il frammento ottenuto dalla digestione. Frammenti con diversa mobilità (taglia molecolare) rappresentano le diverse forme microbiche presenti nella comunità in esame. La miscela di reazione di amplificazione è stata allestita in un volume finale di 20 µl con i seguenti reagenti: *GoTaq* Flexi Buffer 1X, MgCl₂ 1,8 mM, dNTPs 0,2 mM ciascuno, *primer* T7 250 mM, *primer* M13 250 mM, *primer* 16SBact FAM 250 mM, *GoTaq* DNA Polimerasi 1 u. Il protocollo termico utilizzato è il seguente: 94 °C x 2 min, 94 °C x 30 sec, 56 °C x 30 sec, 72°C x 45 sec per 30 cicli e 72 °C x 5 min. Gli amplificati sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 1,8 %. Una reazione di digestione è stata allestita con i seguenti reagenti: NEB buffer2 1X, Enzima *MseI*, BSA 10X. Il volume finale della reazione di digestione è pari a 10 µl, considerando i 5 µl di mix e i 5 µl di prodotto di “PCR di *screening* tre *primer*” diluito 1:200. La digestione è stata effettuata a una temperatura di 37°C per 2 ore e 30 minuti. Prima di procedere con la corsa al capillare il campione è stato diluito e successivamente 5 µl di prodotto di digestione sono stati aggiunti a 7 µl della seguente mix: *GeneScan-500 ROX Size Standard*, *Hi-Di Formamide Genetic Analysis Grade*. Dopo la denaturazione, ogni campione è stato sottoposto ad elettroforesi capillare

utilizzando lo strumento *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* operante in modo *GeneScan*. I risultati ottenuti dalla corsa elettroforetica al capillare sono stati analizzati utilizzando il *software Genotyper 3.7 (Applied Biosystems®)*. Gli *output* sono dei cromatogrammi con in ascissa il tempo di migrazione e in ordinata l'intensità del prodotto amplificato. I prodotti digeriti sono caratterizzati da picchi con diversi tempi di migrazione e diversa intensità. Quando un clone era rappresentato da un picco a 198 bp veniva classificato come *Streptococcus thermophilus*. Se il clone mostrava un altro picco (diverso da 198), oppure un picco a 198 accompagnato da altri picchi di intensità minore, si procedeva con il sequenziamento di tali cloni.

3.11 Sequenziamento dei cloni 16S rRNA

Gli inserti plasmidici sono stati amplificati utilizzando i *primer* universali T7 e M13 come specificato dal produttore (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). E' stato usato uno step di denaturazione iniziale di 2 min a 94°C, seguito da 30 cicli a 94°C per 30 sec, 56°C per 30 sec, 1 min a 72°C un elongazione 72 °C per 5 min in un volume finale di 20 µl. La mix di amplificazione contiene 0,5 U di *GoTaq* polimerasi (*Promega, Madison USA*), 1× *GoTaq* buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0,056 mM di ciascun dNTP, e 250 mM di ciascun *primer*. Queste condizioni di amplificazione permettono il sequenziamento diretto dei prodotti amplificati senza passaggi di purificazione. Il sequenziamento del DNA e del cDNA è stato eseguito usando il *BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit* con l'*AmpliTaq DNA polymerase (Applied BioSystem)* e l'elettroforesi è stata svolta usando il sequenziatore automatico *ABI Prism 3100 Genetic analyzer (Applied BioSystem)*. Prima di essere caricati nel sequenziatore i campioni vengono precipitati utilizzando isopropanolo 75%. Per la lettura dei *file* contenenti le sequenze, viene utilizzato il programma *Chromas*, che permette la visualizzazione dei picchi del segnale di fluorescenza. Da *Chromas* si ricavano poi le sequenze in formato FASTA. Ogni

sequenza del gene 16S rRNA ottenuta è stata identificata confrontando le sequenze disponibili nel database *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Un totale di circa 100-150 cloni sono stati analizzati per ciascun campione sia di DNA che di cDNA. Sono state considerate solo le sequenze che mostravano una percentuale di identità con quelle disponibili nel database *GeneBank* del 97% o più alta.

3.12 Quantificazione microbica tramite *real-time*PCR

L'analisi è stata eseguita utilizzando un test “*target*” e un test “*reference*” (per permettere la normalizzazione dei risultati). Sono stati utilizzati dei *primer* universali che rilevano in modo specifico il 16S rRNA di tutti i batteri (Nadkarni et al., 2002) e dei *primer* specie/genere specifici disegnati su sequenze di geni *housekeeping* o geni conservati implicati in funzioni base necessarie per il mantenimento della cellula. Quattro paia di *primer* sono stati usati per quantificare tre specie e un genere di LAB (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus* spp.). Un saggio è stato sviluppato per rilevare *Pseudomonas* spp. Tutti gli oligonucleotidi che sono stati usati sono riportati in tabella 3.

Il gene della girasib (*gyrB*) è stato usato per disegnare sia *primer* specifici per *Streptococcus thermophilus* che *primer* specifici per *Pediococcus pentosaceus*, mentre i *primer* per *Lactobacillus casei* sono stati selezionati sulla sequenza della ricombinasiA (*recA*). La qRT-PCR per quantificare *Enterococcus* spp. è stata sviluppata in base ad un lavoro precedentemente pubblicato da Frahm et al. 2003 e i *primer* si legano al gene 23S rRNA. I *primer* per rilevare *Pseudomonas* spp. sono disegnati sulla regione del gene *oprF* (la più grande proteina di membrana di *Pseudomonas*) (Bodilis et al., 2007).

<i>primer</i>	<i>sequenza (5'-3')</i>	<i>specie\genere</i>	<i>references</i>
16S_rRNA_F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	Tutti i batteri	Nadkarni et al. 2002
16S_rRNA_R	GGACTACCAGGTATCTAATCCTGTT		
oprF_Pse_F	CAAAAACCTGGCTGACTTCAT	<i>Pseudomonas spp.</i>	Questo studio
oprF_Pse_R	CGGAGTCAGTGTGACCTTCA		
EC_F	AGAAATCCAAACGAACTTG	<i>Enterococcus spp.</i>	He et al. 2005
EC_R	CAGTGCTCTACCTCCATCATT		
Gyrb_St_F	GCACGTCAGAATAAGATTCTCAA	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Questo studio
Gyrb_St_R	GCAGTCAAGCCTTCACGAAC		
Gyrb_Ppent_F	TGAAGAATTAGAAACAGTACTTGGACA	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Questo studio
Gyrb_Ppent_R	ACCAAGACCTTTATAACGTTGAATTAC		
recA_Lcasei_F	ATT GCT CTC CCA GCC AGA C	<i>Lactobacillus casei</i>	Questo studio
recA_Lcasei_R	CAC CAG ACG CGA CTA GTT CA		

Tabella 3: *Primer* usati per la quantificazione microbica tramite *real-time*PCR

A parte i *primer* utilizzati per rilevare gli enterococchi, tutti gli altri oligonucleotidi sono stati disegnati in questo studio. Le sequenze delle diverse specie e dei diversi generi sono state selezionate dal *database GeneBank* e allineate usando CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). I *primer* sono stati disegnati utilizzando il *LightCycler® probe design software* (v 2.0; Roche Applied Science). L'amplificazione è stata effettuata usando lo strumento *LightCycler® 480* (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). La mix di reazione contiene 2,5 µl di DNA o cDNA diluito, 0,25 µl di ciascun *primer* (tabella 3) 10 µM e 5 µl di SYBRgreen I Master Mix IX (Invitrogen, Carlsbad, CA). Il protocollo di amplificazione consiste in uno *step* iniziale di 2 min a 50 °C e 10 min a 95°C, seguito da 45 cicli di 10 sec a 95°C e 1 min a 60°C. Al termine dell'amplificazione è stata effettuata un'analisi della curva di *Melting*. Ogni misurazione è stata fatta in duplicato. Gli *output* delle amplificazioni sono state analizzate con *LightCycler480 Basic Software Version 1.2* (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) usando il metodo della derivata seconda. L'efficienza e il *range* dinamico di ciascuna coppia di *primer* utilizzata sono stati calcolati. Per valutare l'efficienza di ciascun saggio sono state costruite curve *standard* amplificando diluizioni seriali 1:5 del DNA di riferimento. Le curve standard sono state generate interpolando i valori dei Cp in funzione della diluizione di DNA analizzata. Se la reazione ha una buona efficienza i valori di Cp e le concentrazioni iniziali del campione sono legati da una relazione lineare. Se il valore di efficienza è 2 significa che la reazione ha un'efficienza del 100%. Il *range* dinamico è invece l'intervallo di concentrazione di cDNA in cui esiste una relazione lineare tra logaritmo della stessa e i valori di Cp. Se per i campioni analizzati si trovano valori che rientrano dentro questo intervallo allora i dati sono validi. La specificità dei saggi è stata valutata amplificando, per ciascun saggio, specie batteriche *target* e non *target*. Tutti i batteri utilizzati in questo lavoro sono riportati in tabella 2.

Dopo aver messo a punto i diversi saggi, si è passati all'analisi dei campioni di Montasio sul DNA e sul cDNA (latte crudo, cagliata, cagliata a 2, 5, 13 giorni e formaggio a 30, 60 e 90 giorni). Un valore di *fold-change* (FC) per il *target* è stato calcolato per ciascun campione usando il metodo $\Delta\Delta C_p$ ($\Delta C_{p\text{target-reference}}$ del campione – $\Delta C_{p\text{target-reference}}$ de calibratore) scegliendo per ciascun saggio un calibratore (un campione sperimentale di Montasio). Il FC indica quanto più DNA\cDNA è presente in un determinato campione rispetto a quello presente nel campione usato come calibratore, a cui è stato assegnato il valore 1.

3.13 Espressione dei geni TCS di *Streptococcus thermophilus*

Sono stati messi a punto dei test in *real-time*PCR per valutare l'espressione genica di geni TCS (*two-component signal trasduction system*) in *S. thermophilus* nei campioni di Montasio (innesto, latte termizzato, cagliata, formaggio a 2, 5, 13, 30, 60 e 90 giorni). Per la quantificazione dell'espressione genica sono necessari due saggi: uno sul gene *target* di cui si vuole valutare l'espressione, uno su un gene *housekeeping* (per normalizzare). Otto test “*target*” sono stati disegnati per amplificare geni TCS (*hk01*, *rr04*, *hk04*, *rr05*, *hk05*, *rr08*, *hk08*, *hk09*) implicati nel *quorum-sensing* batterico (Hols et al., 2005), mentre per il saggio *reference* sono stati usati *primer* specifici per il gene *housekeeping* *gyrb*. Un gene *housekeeping* è un gene implicato in funzioni di base necessario per il sostentamento delle cellule e quindi costantemente espresso. In questo studio è stato utilizzato il gene *housekeeping* *gyrb*, una delle due subunità della topoisomerasi, un enzima che determina un aumento o una diminuzione del grado di superavvolgimento del DNA. Insieme ad altri enzimi, essa svolge un ruolo fondamentale nell'impacchettamento e nella replicazione del DNA. Sia i *primer* per i geni *target* che per il gene *reference* sono stati disegnati in modo specifico per amplificare solo il cDNA di *S. thermophilus*.

I *primer* usati in questo lavoro sono stati disegnati con il *software LightCycler® probe design software* (v 2.0; Roche Applied Science) e sono elencati in tabella 4. L'amplificazione è stata effettuata in SYBR*green* (con le stesse condizioni descritte nel paragrafo 3.12) e, per valutare l'efficienza di ciascun saggio, sono state costruite curve standard amplificando diluizioni seriali 1:5 del DNA di *Streptococcus thermophilus*. L'efficienza e il range dinamico di ciascuna coppia di *primer* sono state calcolati. Il valore di *fold-change* per ciascun gene *target* è stato calcolato per ciascun campione usando il metodo $\Delta\Delta C_p$ ($\Delta C_{p\text{target-reference}}$ del campione – $\Delta C_{p\text{target-reference}}$ del calibratore) utilizzando come calibratore il campione di Montasio a 30 giorni. Il *fold-change* indica quanto più DNA\cDNA è presente in un determinato campione rispetto a quello presente nel calibratore, a cui è stato assegnato il valore 1.

<i>primer</i>	Sequenza (5'-3')
Rr04_f	GCATTTGTACGGCTATGAGGA
Rr04_r	GCTTTGCACGGATATTCTTGAT
hk04_f	CACTTCGTGAGTCTTTGATGGA
hk04_r	GTCATGTGTCAGGGCAGAAA
rr05_f	TGAGTTTGATAAGGTTATCGGATTAG
rr05_r	CACGGTTAGAAAATGGCTTAGTC
hk05_f	GGTCTGGTAGCCGTTCTTCA
hk05_r	CCGCAATTCGTGACTAACATT
rr08_f	AGGCTATATGCTTAAAACGAGCA
rr08_r	TTCCTCTCCACGGTAAACCTTA
hk08_f	TCGTCCGACAGAACTTGAGA
hk08_r	ACAACACGGATATTGGATTTATCA
hk01_f	TGGGGTAAAAATGATCCTGAA
hk01_r	CCAACATATCGTTAATCATAATCGTC
hk09_f	TTAGCATCCCAGAACCCATC
hk09_r	GAAGTGACGATAATGAAGTCCAGA

Tabella 4: Primer usati in real-timePCR per studiare l'espressione dei geni TCS (two-component signal trasduction system) in *Streptococcus thermophilus*

4. RISULTATI

4.1 Valutazione quali-quantitativa degli acidi nucleici

I campioni (presentati in tabella 5) sono stati prelevati ed estratti come descritto nei “materiali e metodi” ai paragrafi 3.3 e 3.4. Per ogni campione sono state effettuate due misurazioni al *NanoDrop* del DNA e dell’RNA estratto e in tabella viene riportata la media. Il *limit of detection* (LOD) dello strumento arriva a rilevare fino a 2 ng/μl di DNA e RNA. Per questo motivo nei dati relativi all’estrazione dell’RNA dal campione “latte termizzato” e “Montasio 90 giorni” il valore è indicato come < 2,5 ng/μl.

CAMPIONE	DNA (ng/μl)	RNA (ng/μl)
Latte crudo	49,8	7,15
Innesto	3,9	9,74
Latte termizzato	23,4	<2,5
Cagliata	21,2	3
2 gg	30,2	8,46
5 gg	28,2	2,98
13 gg	24,6	11,44
30 gg	32,4	6,42
60 gg	16,7	10
90 gg	13,5	<2,5
150 gg	10,3	2,8

Tabella 5: Quantificazione al *Nanodrop* di DNA e RNA estratti dai campioni

Il DNA delle specie batteriche di riferimento è stato amplificato tramite PCR utilizzando i *primer* universali per il gene 16S rRNA per poi essere sequenziato. Questo ha permesso di confermare, tramite comparazione delle sequenze ottenute con quelle presenti nel database *N.C.B.I.*, tutte le specie di riferimento utilizzate in questo studio. La qualità di DNA e cDNA di tutti i campioni di Montasio, controllata tramite l'analisi delle curve di amplificazione ottenute in *real-time*PCR, utilizzando i *primer* universali 16S rRNA, è risultata buona. In questi saggi in *real-time*PCR per controllare la qualità degli acidi nucleici sono stati inseriti anche tutti i campioni di RNA estratti dai diversi campioni di Montasio (no-RT, RNA non retroscritto) per controllare eventuali contaminazioni da DNA. Non essendo stata rilevata alcuna amplificazione nei campioni di RNA, si è potuto concludere che l'amplificazione ottenuta analizzando il cDNA era dovuta esclusivamente al cDNA e non anche a DNA.

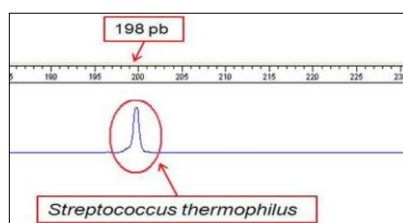
4.2 Analisi bioinformatiche per messa a punto T-RFLP

E' stata eseguita un'analisi di restrizione *in silico* su sequenze 16S rRNA di diversi batteri per ricercare siti discriminanti che permettessero di utilizzare il T-RFLP come metodica di *screening* pre-sequenziamento. L'analisi di restrizione ha permesso di rilevare la presenza di un sito di discriminante tra le sequenze (TTAA) riconosciuto dall'enzima di restrizione *MseI*. Dall'analisi di restrizione *in silico* si è visto che, utilizzando l'enzima *MseI*, *Streptococcus thermophilus* possiede un profilo di restrizione unico con la generazione di un frammento di 198 pb. Sulla base di quest'osservazione si è deciso, considerando che *Streptococcus thermophilus* è la specie batterica predominante del formaggio Montasio, di utilizzare il T-RFLP come metodica di "*screening*". Questo ha permesso di andare a sequenziare solamente quei campioni che, al T-RFLP, non risultavano essere *Streptococcus thermophilus*, con conseguente

risparmio in termini di tempo e costi. Dall'osservazione che l'enzima *MseI* sa generare anche frammenti di altre lunghezze (185 bp, 212 bp, 250 bp) si è deciso di applicare questa metodica anche per effettuare un'analisi rapida e “generale” di tutti i campioni di Montasio (sia DNA che cDNA). A differenza del frammento a 198 bp specifico di *S. thermophilus*, gli altri frammenti non sono identificativi di un'unica specie e quindi permettono solo una visione generale della potenziale microflora presente.

4.3 Messa a punto T-RFLP sul DNA dei ceppi di riferimento

I campioni di DNA di ceppi batterici di riferimento (*Staphylococcus aureus* DSMZ20231, *Enterococcus faecalis* DSMZ20478, *Streptococcus thermophilus* DSMZ 20617, *Lactobacillus plantarum* DSMZ, *Lactococcus lactis* DSM20069) sono stati amplificati con i primer 16S rRNA universali e sono stati digeriti con l'enzima *MseI* (come descritto al paragrafo 3.7). Dopo la digestione, i campioni digeriti sono stati corsi al capillare e gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con il software *Genotyper*. Il risultato di un profilo T-RFLP è un grafico, chiamato elettroferogramma, che è una rappresentazione della corsa elettroforetica. Sull'asse delle x sono segnate le taglie dei frammenti mentre nell'asse y l'intensità di fluorescenza di ciascun frammento. Nell'elettroferogramma ogni picco rappresenta una variante genetica. Poiché le diverse specie hanno un sito di taglio in posizioni diverse, si ottengono frammenti digeriti di varia lunghezza. In figura 1, è riportato l'elettroferogramma ottenuto dall'analisi T-RFLP sul DNA del ceppo di *S. thermophilus* DSMZ 20617 in cui è presente solo il picco distintivo a 198 bp. In questa fase di messa a punto della metodica si sono ottenuti risultati soddisfacenti in quanto nelle specie di riferimento i picchi trovati analizzando gli elettroferogrammi corrispondevano a quelli attesi dall'analisi *in silico*.



4.4 T-RFLP sui campioni di Montasio

I campioni di DNA e cDNA (latte crudo, innesto, cagliata, formaggio a 2, 5, 13, 30 e 60 giorni) sono stati amplificati con i *primer* 16S rRNA universali e sono stati digeriti con l'enzima *MseI* (come descritto al paragrafo 3.8). Dopo la digestione, i DNA\cDNA dei campioni sono stati corsi al capillare e gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con il software *Genotyper*. In figura 2, è riportato l'elettroferogramma ottenuto con il T-RFLP sul DNA di latte crudo dove si possono rilevare tre diversi picchi: uno a circa 185 *bp*, uno a 212 *bp* e uno a 250 *bp*. Il picco a 185 *bp* è caratteristico di *Lactobacillus spp.*, *Moraxella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Chryseobacterium spp.*, *Rhanella spp.* e *Ewigella spp.* Il picco a 212 *bp* è specifico di *Lactococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, mentre quello a 250 *bp* è distintivo di *Psychrobacter spp.* Nella tabella 6, sono presentati i risultati ottenuti dall'analisi di tutti i campioni a DNA e cDNA. Il picco di *S. thermophilus* è presente in tutti i campioni (sia dall'analisi del DNA che del cDNA) tranne che nel latte crudo. Il picco a 185 *bp* è presente in tutti i campioni di DNA, mentre per quanto riguarda il cDNA è presente in tutti i campioni tranne il latte crudo. Il picco a 250 *bp* non è mai presente nei campioni di cDNA, mentre nei campioni di DNA è presente solo nel latte crudo. Il picco a 212, sia nel DNA che nel cDNA, è presente nel latte crudo e poi solo nei campioni nei primi giorni di maturazione del formaggio. Per quanto riguarda il DNA, il picco a 212 si ritrova poi nel Montasio a 60 giorni.

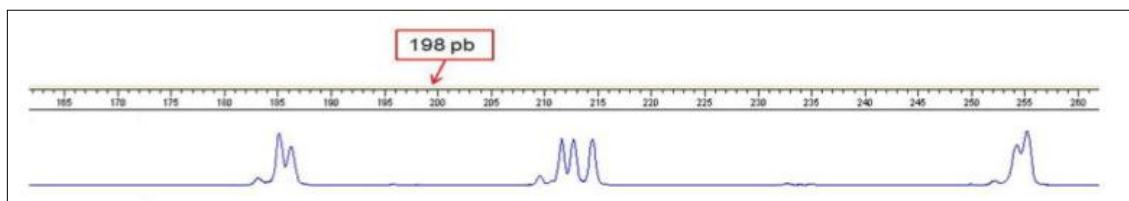


Figura 2: Elettroferogramma ottenuto tramite analisi T-RFLP sul campione di latte

	DNA				cDNA			
	185bp	<i>S.t.</i>	212 bp	250 bp	185 bp	<i>S.t.</i>	212 bp	250 bp
Latte crudo	+	-	+	+	-	-	+	-
Innesto	+	+	-	-	+	+	-	-
Cagliata	+	+	+	-	+	+	+	-
2 giorni	+	+	+	-	+	+	-	-
5 giorni	+	+	+	-	+	+	+	-
13 giorni	+	+	-	-	+	+	-	-
30 giorni	+	+	-	-	+	+	-	-
60 giorni	+	+	+	-	+	+	-	-

Tabella 6: T-RFLP sui campioni di DNA e di cDNA

(+) presenza del picco; (-) assenza del picco

4.5 Screening e sequenziamento dei cloni 16S rRNA

Per studiare la popolazione microbica durante la maturazione del Montasio sono state costruite librerie di cloni a partire dai geni 16S rRNA batterici amplificati da DNA e cDNA di latte crudo, cagliata, cagliata 5 giorni, formaggio a 30 e 60 giorni. Non si è proceduto col sequenziamento diretto di tutti i cloni, ma è stata messa a punto una metodica di *screening* pre-sequenziamento. In questa fase pre-sequenziamento, l'inserito plasmidico 16S rRNA dei cloni è stato amplificato, digerito con l'enzima *MseI*, corso al capillare e gli elettroferogrammi sono stati analizzati con il *software Genotyper* (come descritto al paragrafo 3.10). Quando un clone risultava rappresentato da un elettroferogramma con un solo picco a 198 bp è stato classificato come *Streptococcus thermophilus*. Se quindi il clone mostrava un altro picco (diverso da 198) si procedeva con il sequenziamento di tali cloni (come descritto al paragrafo 3.11). Spesso nell'elettroferogramma comparivano dei falsi picchi che, anche se talvolta di bassa intensità, disturbavano e confondevano l'interpretazione dei risultati. Anche in questi casi risultava necessario procedere con il sequenziamento di questi cloni dubbi. Dopo un'iniziale sfruttamento di tale tecnica, usata per tutte le analisi dei cloni di DNA e su parte dei cloni di RNA, si è deciso, per l'elevato numero di cloni dubbi da sequenziare, che sarebbe stato più conveniente abbandonarla e si è perciò passati al sequenziamento diretto di tutti i cloni. Sono stati identificati circa 100-150 cloni per latte crudo, cagliata, formaggio a 5, 30, 60 giorni sia a livello di cDNA che di DNA. Grazie alla sequenza del clone sequenziato, è stata possibile l'identificazione delle specie batteriche tramite comparazione con il database di sequenze nucleotidiche di NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). I risultati sono presentati nelle tabelle 7-8 e nella figura 3. Tra i cloni di DNA e cDNA per il latte crudo *Pseudomonas* è stato il genere principalmente rappresentato. A partire dal campione "cagliata" la sua presenza e la sua

attività inizia a diminuire. Nel “montasio 30 giorni” *Pseudomonas spp.* non viene più rilevata tra le specie attive mentre. Cloni di *Pseudomonas spp.* sono stati riscontrati in molti punti durante la maturazione del formaggio, alcuni cloni fino al DNA estratto dal formaggio di 60 giorni. Nel latte crudo anche specie di *Psycrobacter* sono state rilevate, ma solo a livello di DNA. Altre specie sono state identificate, sempre a livello di DNA, nel latte crudo come i gruppi minori: *Moraxella*, *Ewingella*, *Rahnella*. *Lactococcus piscium* è stato trovato nel latte crudo sia dall'analisi del cDNA che del DNA, mentre la sua presenza è risultata rilevabile nel formaggio a 5 giorni solo negli estratti di DNA. A partire dalla cagliata e durante tutta la maturazione del formaggio, i microrganismi maggiormente riscontrati fanno parte del gruppo dei LAB. *Streptococcus thermophilus* non è presente nel latte crudo, è aggiunto come starter all'inizio della lavorazione del formaggio e rapidamente diventa la specie più rappresentativa (è presente nel 98% dei cloni negli estratti di cDNA del formaggio a 60 giorni). *S. thermophilus* risulta essere la quasi totalità delle specie vive e attive che compongono la microflora del formaggio Montasio D.O.P. di 30 giorni. *Lactobacillus casei* è stato rilevato a 30 e 60 giorni sia dal DNA che dal cDNA. In particolare nel caso del cDNA, a 30 giorni un solo clone è stato classificato come *Lactobacillus casei* mentre a 60 giorni 20 cloni sono stati identificati come *Lactobacillus casei*). *Lactobacillus fermentum* è presente nel formaggio a 5 giorni ma a livelli bassi (analizzando il cDNA). *Enterococcus spp.* inizia a affermarsi, a bassi livelli, a partire dal campione “Montasio 30 giorni”.

	Latte crudo	Cagliata	5 giorni	30 giorni	60 giorni
<i>Acinetobacter</i> spp.	33	14	0	0	0
<i>Enterococcus</i> spp.	0	0	0	0	0
<i>Lactococcus</i> spp.	0	8	0	0	0
<i>Moraxella</i> spp.	2	0	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	19	30	11	1	1
<i>Psyrhobacter</i> spp.	24	0	0	0	0
<i>Lb. casei</i>	0	0	0	2	2
<i>Lb. fermentum</i>	0	0	0	0	0
<i>Lc. piscium</i>	11	0	2	0	0
<i>S. thermophilus</i>	0	36	144	70	152
<i>Ewingella</i> spp.	1	0	0	0	0
<i>Rhanella</i> spp.	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter</i> spp.	0	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	0	0	0	0	0
<i>Ln. lactis</i>	0	0	0	0	0
<i>S. epidermididis</i>	0	0	0	0	0
<i>Lc. lactis</i>	0	0	0	0	0
<i>Lc. raffinolactis</i>	0	0	0	0	0
<i>Chryseobacterium</i> spp.	2	1	0	0	0
Cloni totali	93	89	157	73	155

Tabella 7. N. di cloni 16S rRNA sequenziati ottenuti usando estratti di DNA

	Latte crudo	Cagliata	5 giorni	30 giorni	60 giorni
<i>Acinetobacter spp.</i>	10	0	0	0	0
<i>Enterococcus spp.</i>	0	0	0	1	1
<i>Lactococcus spp.</i>	0	2	0	0	0
<i>Moraxella spp.</i>	0	1	0	0	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	68	46	9	0	0
<i>Psychrobacter spp.</i>	0	0	0	0	0
<i>Lb. casei</i>	0	0	0	1	20
<i>Lb. fermentum</i>	0	0	1	0	0
<i>Lc. piscium</i>	19	0	0	0	0
<i>S. thermophilus</i>	0	107	104	134	129
<i>Ewingella spp.</i>	0	0	0	0	0
<i>Rhanella spp.</i>	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter spp.</i>	2	0	0	0	0
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	1	0	0	0	0
<i>Ln. lactis</i>	1	0	0	0	0
<i>S. epidermitidis</i>	1	0	0	0	0
<i>Lc. lactis</i>	1	0	0	0	0
<i>Lc. raffinolactis</i>	2	0	0	0	0
<i>Chryseobacterium spp.</i>	2	0	0	0	0
Cloni totali	107	156	114	136	150

Tabella 8: N. di cloni 16S rRNA sequenziati ottenuti usando estratti di RNA

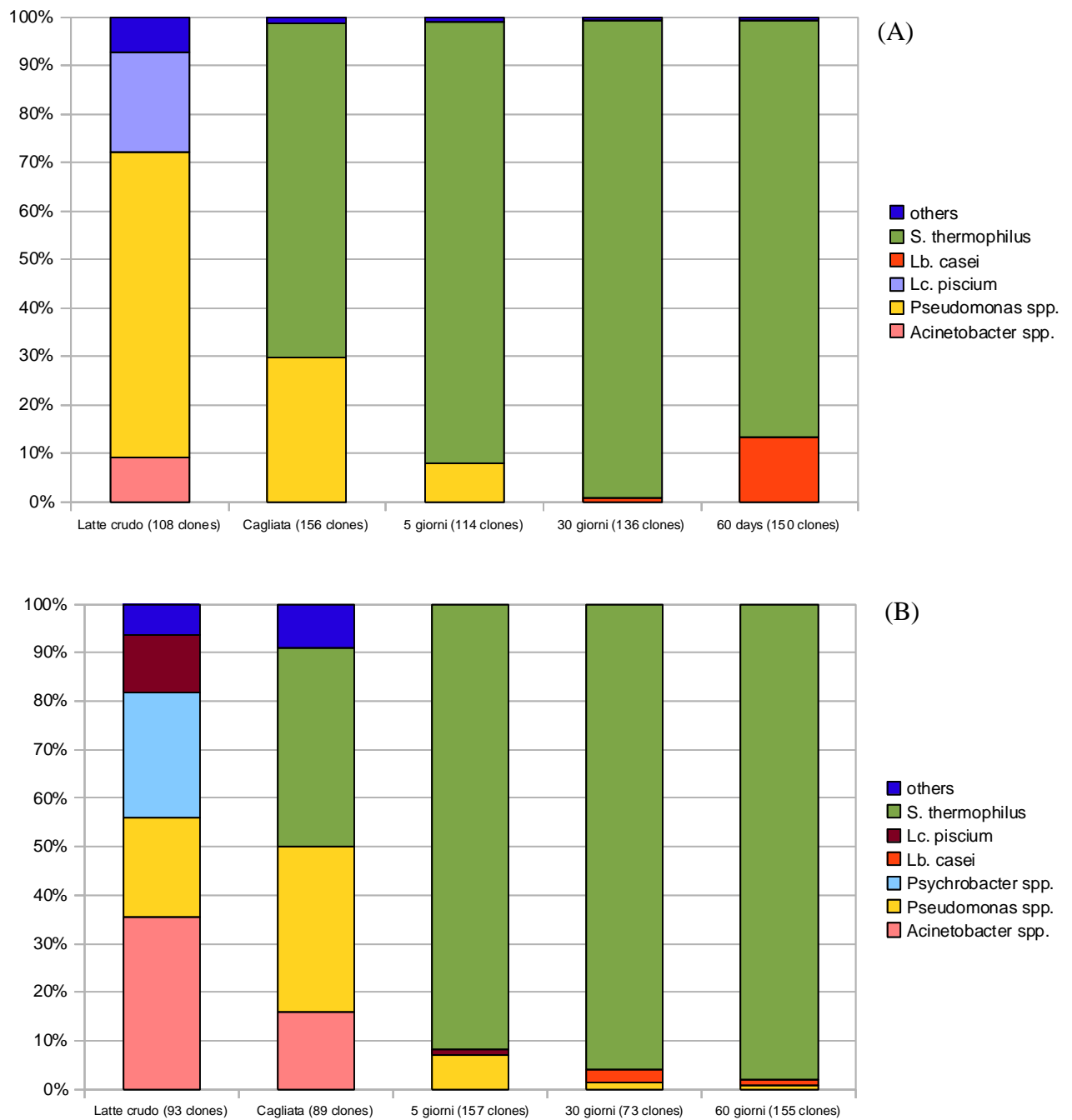


Figura 3: Risultati del sequenziamento delle librerie di cloni 16S rRNA su cDNA (A) e DNA (B)

asse y: % cloni analizzati

asse x: campioni di formaggio

4.6 Rilevamento e quantificazione batteri nei campioni tramite *real-time*PCR

Un approccio che utilizza la *real-time*PCR è stato usato per valutare e confermare i dati ottenuti con lo screening e il sequenziamento dei cloni. Cinque saggi qRT-PCR in SYBR*green* sono stati sviluppati per identificare e monitorare gruppi e specie batterici selezionati durante il processo di maturazione del formaggio Montasio. La specificità dei *primer* è stata testata *in silico* e validata sperimentalmente usando estratti di DNA di specie *target* e non *target* come descritto nel paragrafo 3.12. Quando ΔC_p (specie - specie *target*) > 10 allora il risultato della prova di specificità è stato considerato negativo ossia il saggio è stato considerato non specifico per la specie non *target*. Tutti i saggi hanno mostrato alta specificità (tabella 9) e buona sensibilità (i valori di efficienza, ottenuti dalla costruzione delle curve standard, erano compresi tra 1,9-1,98).

Ceppo di riferimento	Geni specie/genere specifici				
	<i>L.c.</i>	<i>Pp.</i>	<i>S.t.</i>	<i>Ent.</i>	<i>Pse.</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> DSMZ20231	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ20478	-	-	-	+	-
<i>Enterococcus faecium</i> DSMZ20477	-	-	-	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> DSMZ 20617	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSMZ	-	-	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> DSM20069	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc lactis</i> CECT4173	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT184	-	-	-	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	-	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> NTCT9001	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	-	-	-	-	+

Tabella 9: Specificità dei saggi qRT-PCR per le quantificazioni batteriche

L.c.: *Lactobacillus casei*

Pp.: *Pediococcus pentosaceus*

S.t.: *Streptococcus thermophilus*

Ent.: *Enterococcus* spp.

Pse.: *Pseudomonas* spp.

(-) : $\Delta C_n(\text{species} - \text{species target}) > 10$

Le analisi qRT-PCR dei campioni di Montasio sono state replicate in due esperimenti differenti e i risultati sono presentati in tabella 10, dove i dati sono riportati come valori FC medi \pm deviazione standard. Le dinamiche della comunità microbica sono presentate in grafici che mostrano le diverse quantità batteriche (espresse come FC) durante il processo di maturazione (figura 4). Un valore elevato di cDNA di *Pseudomonas* spp. (FC di circa 100) è stato rilevato nel latte crudo, poi esso rapidamente diminuisce durante i primi stadi di maturazione. Per quanto riguarda l'analisi del DNA, *Pseudomonas* spp. viene rilevata fino a 5 giorni di maturazione e poi si ritrova nel campione a 90 giorni con un FC di 0,35. *Lactobacillus casei* è stato rilevato nei processi tardivi di maturazione, sono stati calcolati FC elevati (sia per il DNA che per il cDNA) a 90 giorni di maturazione. Il trend di *Lactobacillus casei* è opposto a quello di *Pseudomonas* spp. *Streptococcus thermophilus* non è riscontrato nel latte crudo, i suoi DNA\cDNA sono rilevati a partire dal campione cagliata fino al campione 90 giorni. In tutti i punti analizzati i suoi valori di FC rimangono abbastanza simili all'unità cioè al valore del calibratore (Montasio 30 giorni). Le specie del genere *Enterococcus* mostrano un picco rilevante a 30 giorni dall'analisi del cDNA e due picchi a 2 giorni e 90 giorni per quanto riguarda il DNA. Gli acidi nucleici di *Pediococcus pentosaceus* sono stati amplificati solo nel campione a 30 giorni e mostravano un basso livello di amplificazione sia analizzando il cDNA che l'RNA. Il DNA di *Pseudomonas* spp. e *Enterococcus* spp. è stato rilevato nel latte crudo in quantità più bassa rispetto alla quantità trovata nel campione a 2 giorni.

Media FC ± deviazione standard								
target	Latte	Cagliata	2 gg	5 gg	13 gg	30 gg	60 gg	90 gg
cDNA	0	0	0	0	0	0,08±0,02	1	15±0,7
L.c.								
DNA	0	0	0	0	0	0	1	26,14±0,94
cDNA	0	0	0	0	0	1	0	0
P.p.								
DNA	0	0	0	0	0	1	0	0
cDNA	0	1,30±0,14	1,55±0,35	2,55±0,49	0,75±0,21	1	0,80±0	2,35±0,64
S.t.								
DNA	0	0,25±0,21	3,95±0,35	2,60±0	0,65±0,07	1	0,55±0,07	8,45±1,77
cDNA	1	0,1±0	0,4±0	0,55±0,07	0,25±0,07	17,55±0,78	3,05±1,2	1,4±0,14
Ent.								
DNA	1	3,7±0,28	21,1±5,37	2,75±0,21	0,3±0	0,8±0	1,25±0,07	29,5±9,48
cDNA	98,5±6,36	53±4,24	1	0	0	0	0	0
Pse.								
DNA	0,75±0,07	1,35±0,21	1	0,7±0,14	0	0	0	0,35±0,07

Tabella 10: Quantificazione batterica (DNA\cDNA) nei campioni di Montasio tramite qRT-PCR

L.c.: *Lactobacillus casei*
P.p.: *Pediococcus pentosaceus*
S.t.: *Streptococcus thermophilus*
Ent.: *Enterococcus* spp.
Pse.: *Pseudomonas* spp.

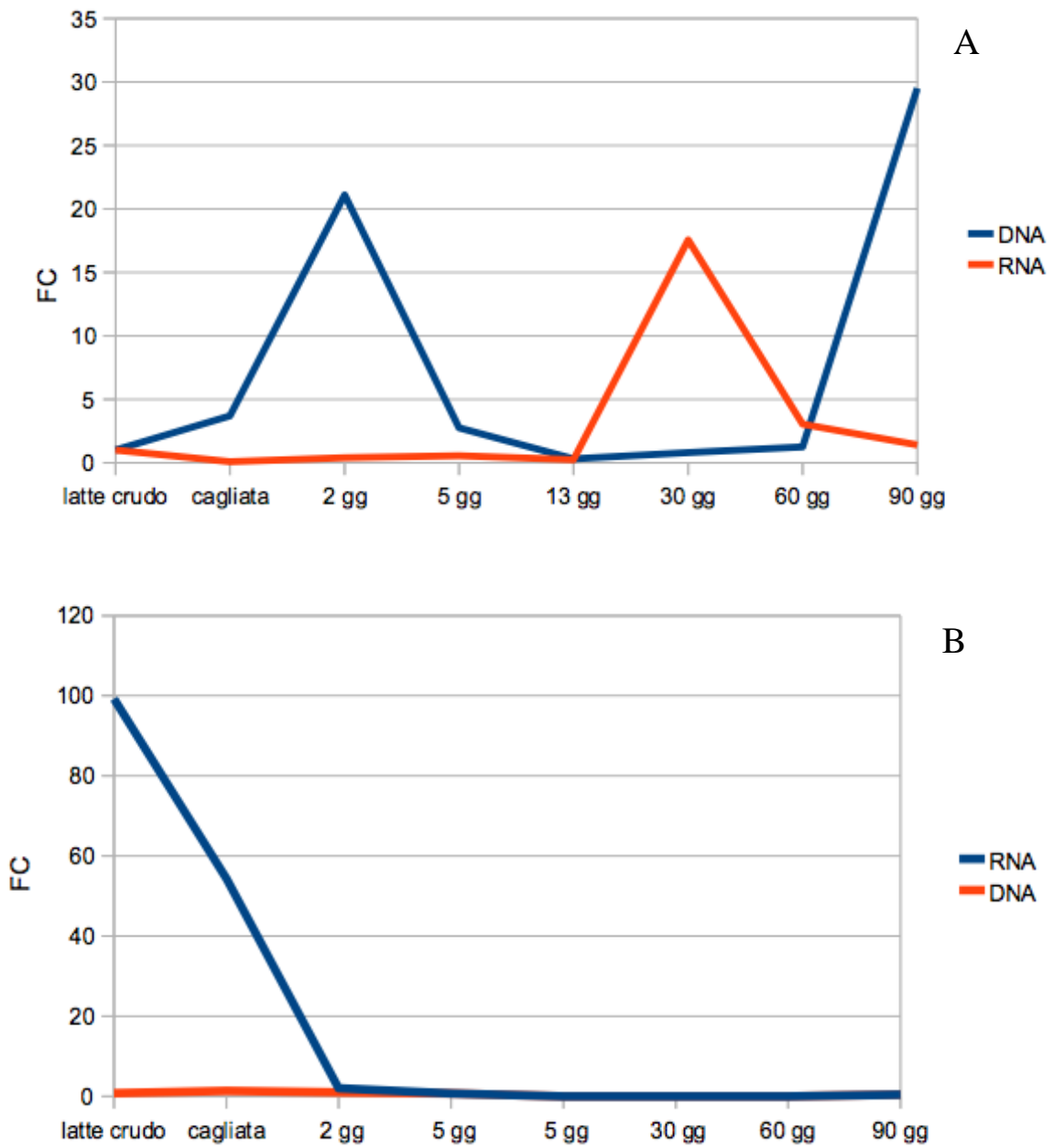


Figura 4A: Risultati qRT-PCR per la quantificazione batterica nei campioni di Montasio

A: *Enterococcus* spp.

B: *Pseudomonas* spp.

FC: fold-change

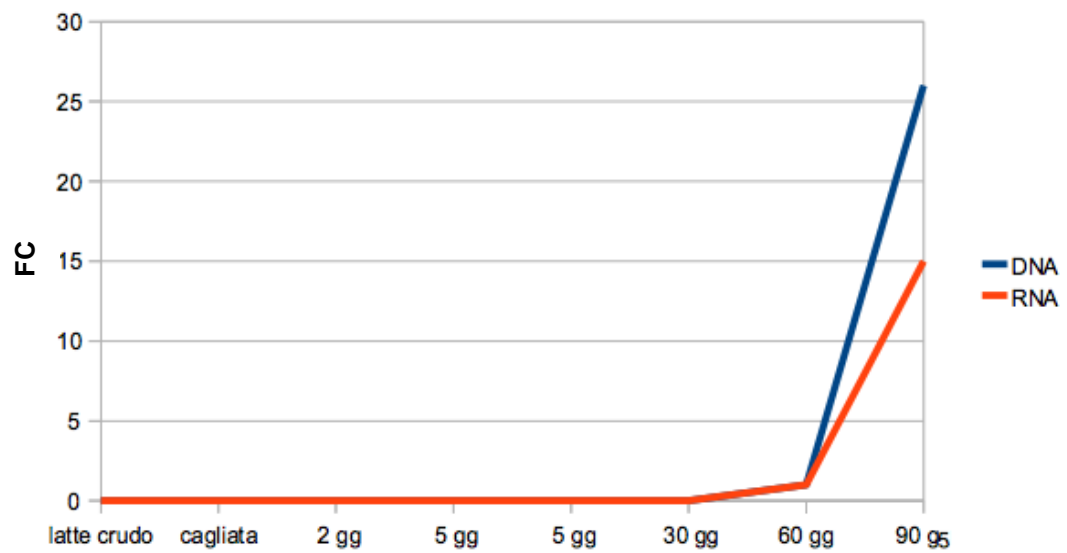
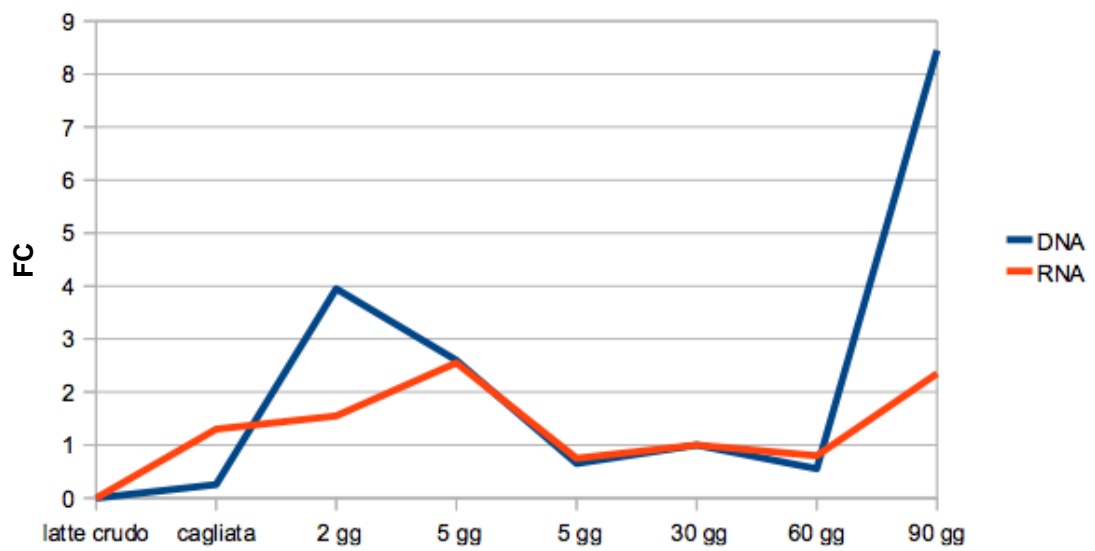


Figura 4B: Risultati qRT-PCR per la quantificazione batterica nei campioni di Montasio

C: Streptococcus thermophilus

D: Lactobacillus casei

FC: fold-change

4.7 Espressione geni *TCS* tramite RT-PCR in *Streptococcus thermophilus*

Per valutare l'espressione di geni *TCS* (*two-component signal trasduction system*) in *S. thermophilus* sono stati eseguiti dei saggi in *real-time*PCR nei campioni di Montasio (innesto, latte termizzato, cagliata, formaggio a 2, 5, 13, 30, 60 e 90 giorni). I *primer* sono stati testati sui ceppi di riferimento tramite prove di specificità e sono risultati essere tutti specifici per *S. thermophilus*. Le rette standard costruite per ciascuna coppia di *primer* hanno mostrato una buona efficienza (tabella 11) a parte *hk04* e *hk01* che presentavano valori di efficienza più bassi.

Test	Range Dinamico	Efficienza
<i>rr04</i>	17,2 → 30	1,93
<i>hk04</i>	17,8 → 30,7	1,89
<i>rr05</i>	16,3 → 28,3	1,93
<i>hk05</i>	16 → 28,8	1,93
<i>rr08</i>	16,7 → 28,8	2
<i>hk08</i>	17 → 29	1,91
<i>hk01</i>	19,2 → 30	1,87
<i>hk09</i>	15,8 → 28,2	1,92

Tabella 11: Valori di efficienza delle curve standard dei saggi di espressione genica in *realtime*PCR

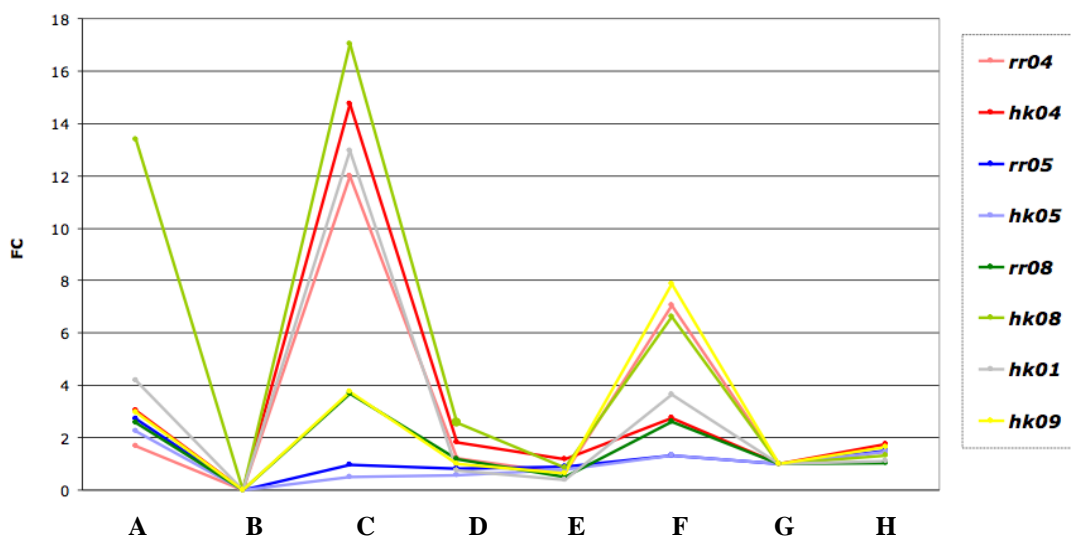


Figura 5: Risultati dell'analisi dell'espressione dei geni TCS

A: Innesto;
 B: Latte termizzato;
 C: Cagliata;
 D: 2 giorni;
 E: 5 giorni;
 F: 13 giorni;
 G: 30 giorni;
 H: 60 giorni
 FC: *fold-change*

E' stata valutata la variabilità nell'espressione del gene *housekeeping gyrb* nei vari punti di maturazione del formaggio e non sono state riscontrate variazioni nell'espressione nei diversi campioni analizzati.

I risultati dell'analisi dei diversi geni TCS nei campioni di Montasio sono presentati in figura 5 dove sono riuniti gli andamenti delle variazioni di espressione degli otto geni lungo la maturazione del formaggio. Si può notare che nel latte termizzato l'espressione di tutti i geni è praticamente azzerata. In due punti specifici ("cagliata" e "formaggio a 13 giorni") molti dei geni studiati presentano un picco di espressione e in particolare nel campione "cagliata" si rilevano i valori di FC più elevati (il gene *hk08* risulta 17 volte più espresso nella cagliata rispetto al campione "Montasio 30 giorni" che è stato usato come calibratore. Il gene per l'istidina chinasi (*hk*) e quello per il regolatore di risposta (*rr*) associati al *TCS05* non mostrano grandi variazioni nell'espressione tra i campioni.

5. DISCUSSIONE

Il primo passo per proteggere la biodiversità microbica nei prodotti lattiero-caseari D.O.P. è la conoscenza dell'evoluzione della microflora durante i processi di produzione e maturazione. In questo studio, la diversità delle comunità batteriche durante la maturazione del formaggio Montasio è stata indagata usando metodi cultura-indipendenti. Questo progetto vuole anche essere uno studio sull'utilizzo delle più recenti metodiche molecolari (su DNA ed RNA) quali alternative alle metodiche classiche per la caratterizzazione della microflora presente in prodotti fermentati. Per questo motivo si sono sperimentate diverse metodologie di analisi alternative quali *screening* per sequenziamento di librerie di amplificati, T-RFLP e quantificazioni in *real-time*PCR per caratterizzare le comunità microbiche. In questo modo si sono potuti valutare e confrontare i risultati ottenuti dalle diverse metodiche e la loro applicabilità a tali studi. Grazie alle analisi sul DNA è stato possibile valutare la presenza totale di microrganismi durante le varie fasi di produzione, e tramite l'analisi dell'RNA valutare quali tra i presenti erano attivi. Infatti, con l'analisi del DNA si ha una visione generale delle specie presenti senza però poter distinguere tra quelle vitali e quelle non vitali. Dall'analisi del DNA per il latte crudo ad esempio, è emerso che sono presenti molte specie batteriche, soprattutto saprofiti deterioranti, ma analizzando solo il DNA non si può sapere se le specie deterioranti al momento del campionamento fossero ancora vitali. Dal lato opposto, con la sola analisi dell'RNA o con le metodiche di microbiologia classica, se si avesse a disposizione un solo punto della filiera del Montasio da poter analizzare, non si potrebbero fare valutazioni sulle pratiche di lavorazione e gestione avvenute nelle prime fasi di produzione del formaggio, prima della termizzazione del latte. Per avere una visione completa è necessario quindi analizzare sia il DNA che l'RNA da tutte le fasi di produzione del formaggio.

5.1 Analisi quanti-qualitativa degli acidi nucleici

Il DNA e l'RNA sono stati estratti direttamente dalla matrice formaggio senza utilizzare alcuna metodica di microbiologia classica di isolamento. Gli acidi nucleici (sia DNA che RNA) sono stati estratti in modo efficiente fino a 90 giorni e molti generi batterici sono stati identificati indicando che non ci sono stati *bias* rilevanti nell'efficienza di lisi tra le diverse specie e tra i batteri Gram positivi e Gram negativi. Per ottenere DNA ed RNA di buona qualità, in particolare per l'utilizzo in PCR *real-time* abbiamo deciso di utilizzare *kit* commerciali. E' stato necessario modificare i protocolli di estrazione *Invisorb*® (per DNA) e *Qiagen*® (per RNA) nelle loro fasi iniziali per poterli adattare alla "matrice formaggio". L'estrazione ha dato buoni risultati anche se la resa si riduceva col progredire del tempo di stagionatura del Montasio. Infatti, la qualità del DNA e dell'RNA iniziava a diminuire dal campione Montasio stagionato 60 giorni e questo probabilmente è la conseguenza della modificazione dell'ambiente e della microflora stessa durante la maturazione. I campioni di formaggio a 90 e 150 giorni presentano una concentrazione molto bassa in acidi nucleici e questo potrebbe forse essere dovuto alla presenza di agenti di degradazione (come DNAasi e RNAasi) nella matrice formaggio. Inoltre, l'amplificazione del campione 150 giorni risultava impossibile (forse per la presenza di inibitori) e perciò questo campione è stato escluso dalle analisi. L'analisi dei campioni di RNA noRT (non retrotrascritto) in *real-time*PCR non ha mostrato amplificazione, questo ha permesso di escludere la presenza di contaminazioni di DNA negli estratti di RNA.

5.2 Clonaggio, sequenziamento, T-RFLP, RT-PCR

Per identificare le popolazioni batteriche di latte crudo e campioni di formaggio, sono state costruite librerie di cloni a partire da 16S rRNA amplificati da DNA (e cDNA). Il gene 16S rRNA contiene regioni ipervariabili fiancheggiate da sequenze conservate che

possono servire da ancore per *primer* universali. Queste caratteristiche li rendono i *marker* ideali per l'identificazione di specie e la valutazione della diversità all'interno di comunità. In generale, 16S rRNA è stato usato in modo estensivo per studiare la diversità microbica e permette l'identificazione dei procarioti così come la comprensione delle relazioni filogenetiche (Kirk et al., 2004). Tuttavia è da tener presente, per alcuni batteri, le analisi delle sequenze 16S rRNA non sono sufficienti per classificare fino al livello di specie e risulta possibile definire solo il genere (per esempio *Pseudomonas* spp.). Le metodiche molecolari coltura indipendenti (come il sequenziamento di librerie di cloni) vengono usate per superare i limiti dei metodi colturali classici. Anche il sequenziamento di librerie di cloni mostra tuttavia dei limiti, soprattutto per quanto riguarda tempi e costi. Per questo si è voluto provare a mettere a punto una metodica, utilizzando la tecnica del T-RFLP, di screening pre-sequenziamento che permettesse di limitare il numero di cloni da sequenziare. In generale la tecnica non è stata di facile applicazione soprattutto per la comparsa nell'elettroferogramma di “falsi picchi”. Questi falsi picchi sono generalmente di due tipi: “*background noises*” e “*pseudo TRF*”. I “*background noises*” sono picchi che risultano dalla sensibilità del detector in uso. Questi picchi sono spesso piccoli e di solito sono un problema nel caso l'intensità totale del profilo sia bassa (es. bassa concentrazione di campione amplificato). Gli “*pseudo TRF*” sono picchi riproducibili e sono lineari alla quantità di DNA caricata. Questi picchi possono essere dovuti al fatto che il DNA singolo filamento potrebbe appaiarsi su se stesso creando siti di restrizione casuali a doppio filamento che sono poi riconosciuti dall'enzima di restrizione. Questo porta a frammenti che non rappresentano alcuna reale variante genetica. La tecnica del T-RFLP (anche se messa a punto per altri scopi) è stata applicata all'analisi dei campioni di RNA e cDNA di Montasio. I risultati offrono solo una panoramica generale sulle caratteristiche della microflora del Montasio. Confrontando gli elettroferogrammi si può valutare la

presenza\assenza e l'intensità dei picchi tra i diversi campioni. In generale, i dati ottenuti concordano abbastanza con i dati ottenuti con il sequenziamento. Tuttavia, l'analisi con l'enzima *MseI* ci permettere di distinguere bene solo *S. thermophilus* mentre le altre specie di interesse non sono distinguibili perché un picco può essere rappresentativo di più specie. Diversi batteri presenti nella popolazione potrebbero dare lo stesso picco nell'elettroferogramma per la presenza del sito di restrizione nella stessa posizione. Per superare questo problema e aumentare il potere risolutivo della tecnica i campioni dovrebbero essere digeriti in parallelo con diversi enzimi (anche tre) ottenendo così tre diversi profili per campione (Liu et al., 1997). Se una libreria di cloni è costruita in parallelo con la metodica T-RFLP (come in questo studio) allora i cloni possono essere usati per valutare e interpretare il profilo T-RFLP. Dalle informazioni ottenute dall'analisi *in silico* e dal sequenziamento dei cloni è stato quindi possibile interpretare i risultati ottenuti con il T-RFLP. Il picco a 198 bp caratteristico di *Streptococcus thermophilus* non si ritrova, come atteso, nel latte crudo sia dall'analisi del DNA che del cDNA ma si rileva invece a partire dall'innesto fino al formaggio 60 giorni. Il picco a 185 bp (*Lactobacillus* spp., *Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp., *Chryseobacterium* spp., *Rhanella* spp., *Ewigella* spp) si rileva nel “latte crudo” analizzando il DNA, mentre è assente analizzando il cDNA. Confrontando questi risultati con quelli ottenuti dal sequenziamento si vede invece che, analizzando il cDNA, sono stati sequenziati anche cloni di *Acinetobacter* spp e *Chryseobacterium* spp. Dunque, oltre a problemi relativi a “rumori di fondo” e aspecifici, il T-RFLP è risultato anche di bassa efficienza. I risultati devono quindi essere necessariamente accoppiati e integrati con quelli ottenuti con le altre metodiche. I dati ottenuti dal sequenziamento dei cloni delle librerie 16S e dal T-RFLP permettono di ottenere una visione generale della comunità batterica e, allo stesso tempo, sono insufficienti per avere una quantificazione microbica accurata e realistica. Usando una qRT-PCR è possibile superare questi *bias* nella quantificazione ed è

possibile monitorare le dinamiche durante la maturazione del formaggio. Cinque saggi specifici qRT-PCR sono stati disegnati per rilevare e quantificare alcuni generi o specie rilevanti di interesse tecnologico. Inizialmente la microflora è molto varia. Questa variabilità è essenzialmente dovuta all'utilizzo di latte crudo non pastorizzato contenente perciò numerose specie microbiche. Il latte crudo non ha subito alcun processo termico e pertanto sono presenti numerose specie batteriche contaminanti. Elevate quantità di RNA di *Pseudomonas* spp. sono state rilevate nel latte crudo e tracce di DNA sono state identificate anche nel formaggio stagionato. Importante notare la presenza, ma soprattutto l'attività, di *Pseudomonas* spp., generalmente *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas fragi*. Le specie batteriche non patogene determinano la qualità del latte e limitano la *shelf-life* attraverso la formazione di cattivi odori, acidificazione involontaria e difetti nella struttura. I batteri psicotrofi, la maggiorparte rappresentata da *Pseudomonas fluorescens*, sono gli agenti che causano il deterioramento del latte. La contaminazione del latte avviene nell'ambiente dell'allevamento, durante la raccolta e durante lo stoccaggio. I psicotrofi e i loro enzimi extracellulari giocano un ruolo importante nel deterioramento del latte refrigerato. Questi batteri sanno crescere a 7°C sebbene la loro temperatura ottimale di crescita sia più elevata. Durante la conservazione a freddo dopo la raccolta del latte essi dominano la flora e i loro enzimi extracellulari, soprattutto proteasi e lipasi, contribuiscono al deterioramento dei prodotti lattiero-caseari (Mucchetti 2006). E' molto importante riuscire a identificare e quantificare i microrganismi che possono limitare la *shelf-life* del prodotto.

Pseudomonas spp., *Acinetobacter* spp. ed *Enterobacter* spp., che sono i psicotrofi più frequentemente riportati nel latte crudo, sono stati trovati anche nei nostri campioni di latte attraverso il sequenziamento dei cloni delle librerie. *Pseudomonas* spp. risulta a livelli elevati nel latte crudo e questi risultati sono in accordo con l'FC ottenuti

utilizzando qRT-PCR su RNA. *Streptococcus thermophilus* dopo essere stato aggiunto come starter raggiunge rapidamente valori elevati. Solitamente, durante e dopo la fase della cagliata, nella quale si ha un aumento della temperatura fino ai 42-48°C, si ha un aumento delle specie termofile, in particolare *S. thermophilus*. *S. thermophilus* nella fermentazione del latte causa la rapida conversione del lattosio in acido lattico, causando una rapida diminuzione del pH e la produzione di metaboliti importanti per le loro proprietà tecnologiche (Delorme et al., 2008). L'abbassamento del pH ad opera di *S. thermophilus* impedisce la crescita di batteri deterioranti, come le *Pseudomonas* spp. In questo studio per il campione “cagliata” è stata evidenziata la situazione appena descritta e cioè che il numero di specie batteriche e le loro percentuali calano, in virtù di un netto aumento di *S. thermophilus*. Inoltre, si può notare come *Acinetobacter* spp., rilevato con l'analisi del DNA, non sia presente invece dall'analisi del cDNA, segno che tali batteri non sono vitali. All'aumentare del tempo di maturazione iniziano a comparire microrganismi mesofili non starter, quali *L. casei* e enterococchi, entrambi fondamentali per lo sviluppo delle proprietà organolettiche del prodotto. Nei campioni di formaggio stagionati i lattobacilli eterofermentativi e gli enterococchi appartengono alla cosiddetta “microflora secondaria”. A parte la loro importanza nella conservazione degli alimenti e nella fermentazione, alcuni ceppi di *Lactobacillus* hanno anche proprietà probiotiche. Dalla “cagliata 5 giorni” iniziano ad essere favoriti i lattobacilli. *Lactobacillus casei* è stato rilevato con qRT-PCR a partire dal “Montasio 30 giorni” e questo conferma i dati del sequenziamento. *L. casei* è un organismo mesofilo non starter, importante per la maturazione del prodotto e per lo sviluppo delle qualità organolettiche, che solitamente aumenta in percentuale dopo il calo degli starter termofili (Mucchetti 2006). Nel campione “Montasio 60 giorni” in concomitanza dell'aumento di *L. casei*, si vede un calo dell'attività di *S. thermophilus*. Gli enterococchi sono stati amplificati con qRT-PCR durante tutto il periodo di maturazione, ma sembrano essere presenti a livelli molto

bassi dai dati ottenuti con il sequenziamento. Nei prodotti lattiero-caseari, le specie appartenenti al genere *Enterococcus* più frequentemente ritrovate sono *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*. Gli enterococchi sono stati segnalati essere uno dei gruppi più resistenti alle avverse condizioni microbiologiche come il sale e l'acidità, il che spiega la loro presenza in diversi formaggi (Zago et al., 2009; Giraffa et al., 2003). In generale, la maggior parte dei generi batteri individuati durante la maturazione del Montasio sono LAB. I LAB sono presenti a bassi valori nel latte ma aumentano in modo marcato fin dalle prime fasi di maturazione del formaggio. Sia la flora starter che secondaria modificano le proprietà fisiche e chimiche del formaggio, contribuendo e rispondendo ai cambiamenti ambientali che si verificano durante la produzione e la stagionatura del formaggio (Coppola et al., 2007). La presenza dei LAB negli alimenti fermentati migliora la sicurezza sanitaria e la *shelf-life* degli alimenti attraverso la produzione di molti composti antimicrobici, acidi organici (lattico, acetico, ecc), perossido di idrogeno, diacetile e peptidi antimicrobici (batteriocine) (Topisirovic et al., 2006). Questi dati confermano i precedenti risultati ottenuti studiando la microflora del Montasio con metodi microbiologici tradizionali (Marino et al., 2003). Punto importante è che, in questo lavoro, sono stati analizzati sia DNA che RNA. Il confronto DNA-RNA permette di capire quali sono le cellule vitali presenti e di identificare gli eventuali pericoli e punti di contaminazione durante le fasi di produzione del formaggio. C'è una netta differenza tra ciò che è rilevato analizzando il DNA e ciò che è rilevato analizzando l'RNA. Se ci si fosse limitati solo allo studio del primo, non si avrebbe potuto affermare con certezza quali specie microbiche svolgono un ruolo, più o meno importante, nella produzione del formaggio Montasio. L'analisi dell'RNA, molecola *marker* di vitalità, ci ha permesso di discriminare i batteri vivi e attivi dai batteri non vitali. Individuare una specie batterica con metodiche basate solo sul DNA non ci fornisce la certezza che queste siano vitali. Un esempio di questo ci viene fornito

dall'analisi del latte crudo. Molte delle specie che incontriamo a livello del DNA in questo campione, come *Moraxella* spp., non vengono riscontrate a livello dell'RNA. Ciò significa che quello che noi vediamo a livello del DNA, è solamente il materiale genetico residuo del batterio dopo la sua morte. Inoltre, possono esserci notevoli differenze tra le percentuali del medesimo batterio analizzando DNA e RNA. Riferito sempre al primo punto analizzato, il latte crudo, notiamo come ad esempio, *Pseudomonas* spp., presenti un valore percentuale maggiore con l'RNA rispetto alla percentuale rivelata con il DNA. Ciò significa che le condizioni favoriscono tale batterio, che quindi sarà metabolicamente molto attivo. In linea generale possiamo affermare che, al crescere della percentuale dei valori di DNA, crescono anche quelli dell' RNA. Nel caso una specie non venga individuata a livello dell'RNA, come ad esempio *Pseudomonas* spp. nel Montasio a 30 e 60 giorni, non sempre accade lo stesso a livello del DNA.

5.3 Espressione genica

Una volta valutata la microflora in quanto a presenza e quantificazione delle diverse specie batteriche il passo successivo è stato valutare l'attività (intesa in termini di espressione genica) di alcune di queste specie. L' approccio è stato concentrato sulla specie riconosciuta essere la predominante nella maturazione del Montasio, *S. thermophilus*. In questo studio, non sono state riscontrate variazioni nell'espressione del gene *gyrb* (*housekeeping*) nei vari punti di maturazione del formaggio e questo è fondamentale in quanto, negli studi di espressione, gli *housekeeping* devono essere il più stabili possibili (non devono subire variazioni in diverse condizioni). Per verificare l'applicabilità di test di espressione genica in campioni di cDNA ottenuto da RNA batterico estratto direttamente dalla matrice formaggio, dei saggi in *real-time-PCR* sono stati utilizzati per cercare di misurare l'espressione genica di otto geni implicati nel

sistema *quorum-sensing* in *Streptococcus thermophilus*. Il *quorum-sensing* è un sistema di comunicazione cellula-cellula con il quale i batteri sono in grado di comunicare tra loro e di mettere in atto attività coordinate (approfondimento a pag. 96). Questo sistema è formato da due differenti tipi di proteine: istidina-chinasi (*hk*), proteina sensore collocata sulla facciata esterna della membrana e da un regolatore citoplasmatico di risposta (*rr*). Poiché il gene per l'istidina chinasi (*hk*) e quello per il regolatore di risposta (*rr*) codificano per le due proteine che formano il sistema di trasduzione del segnale a due componenti (*TCS*), i due geni sono contenuti in un unico operone. Un andamento abbastanza coordinato è stato notato tra i geni *hk* e *rr* sia di *TCS04* che di *TCS05*. Per quanto riguarda *TCS08*, *hk* e *rr* tra loro mostrano un livello molto diverso di espressione nel campione "cagliata". *Hk08* e *rr08* sono coinvolti nelle risposte al sale e allo stress osmotico. Per *hk05* e *rr05* sembrano non esserci variazioni di espressione lungo le fasi di maturazione del formaggio. *TCS05* è simile al *TCS* di *S. pneumoniae* e *Lc. lactis*, in queste specie è stato dimostrato essere associato alla condizione di vitalità. Nel latte termizzato l'espressione è azzerata probabilmente perché il processo di termizzazione uccide quasi tutti i batteri presenti nel latte. La probabile spiegazione del fatto che nei campioni "cagliata" e "cagliata 13 giorni" molti geni presentano un picco di espressione potrebbe essere legata alle condizioni ambientali in cui si ritrova l'"ecosistema formaggio" in questi due punti di maturazione. Aldilà del significato biologico di questi risultati, quello che in realtà è interessante da dire è che, essendoci chiare variazioni di espressione lungo le diverse fasi di maturazione, gli studi di espressione genica sono stati applicati con successo.

6. CONCLUSIONI

In questo progetto si è studiata la biodiversità microbica durante le fasi di produzione del formaggio Montasio attraverso un approccio che ha utilizzato metodiche molecolari coltura-indipendenti. Con il sequenziamento dei cloni delle librerie 16S rRNA\RNA sono stati identificati nel latte crudo batteri psicotrofi appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Acinetobacter*. Negli altri campioni analizzati la microflora è risultata costituita prevalentemente da batteri lattici, microrganismi che hanno un ruolo fondamentale nella produzione e maturazione del formaggio. *Streptococcus thermophilus*, utilizzato come starter per le sue importanti proprietà acidificanti, è risultata la specie dominante durante l'intero periodo di maturazione del Montasio. Con la qRT-PCR elevate quantità di RNA di *Pseudomonas* spp. sono state rilevate nel latte crudo e tracce di DNA sono state identificate anche nel formaggio stagionato. *Streptococcus thermophilus* dopo essere stato aggiunto come starter raggiunge rapidamente valori elevati. Gli enterococchi sono stati rilevati lungo tutto il processo di produzione del Montasio mentre *Lactobacillus casei* e *Pediococcus pentosaceus* sono stati identificati a partire dal formaggio stagionato 30 giorni. I risultati del T-RFLP non sono stati di semplice interpretazione a causa dei limiti intrinseci alla stessa metodica, ma in generale, i dati ottenuti dall'analisi diretta dei campioni hanno confermato i risultati del sequenziamento. Integrando i risultati del sequenziamento dei cloni delle librerie 16S rRNA (da DNA\RNA) con quelli della qRT-PCR e del T-RFLP si sono ottenute informazioni complementari sulle caratteristiche della microflora del formaggio. I risultati di questo lavoro saranno integrati con quelli ottenuti sugli stessi campioni dai colleghi dell'Università di Udine con un approccio di analisi coltura dipendente. In generale, ogni metodo ha dei limiti e fornisce solo un quadro parziale di un aspetto della diversità microbica. È difficile valutare l'efficacia di ogni metodo e perciò è consigliabile che lo studio della popolazione microbica venga portata avanti a

diversi livelli. Utilizzando diversi metodi si ottiene una panoramica più completa sulla diversità della microflora e una valutazione globale dei cambiamenti nella struttura microbica. Utilizzando quindi un approccio che unisce metodi cultura-dipendente e cultura metodi indipendenti, si può avere una visione più precisa della struttura della comunità microbica. Le informazioni continuamente offerte dalla genomica offrono, e offriranno sempre di più in futuro, una risorsa importante per il miglioramento delle tecnologie di quantificazione, di rilevamento e di identificazione dei batteri nella catena di produzione del latte e dei suoi derivati. In questo lavoro, i saggi in *real-time*PCR per studiare l'espressione di otto geni implicati nel sistema *quorum-sensing* in *Streptococcus thermophilus* hanno dato risultati interessanti. Visti questi dati incoraggianti, ci si sente di dire che, l'RNA estratto con la metodica messa a punto in questo studio è quindi analizzabile in studi di espressione genica e, potenzialmente (accertata la sua qualità con strumenti più sofisticati) potrebbe anche essere studiato con la tecnologia innovativa dei *microarray*. Applicazioni future di queste tipologie di studio potrebbero riguardare analisi di espressione di geni interessanti per la produzione di prodotti lattiero-caseari.

**Lavoro sperimentale svolto presso il Dipartimento di Genetica dell'Università
Cattolica di Louvain-la-Neuve (Belgio)**

**Funzionalità e diversità genetica del locus *blp* codificante batteriocine
in *Streptococcus thermophilus***

1.INTRODUZIONE

1.1 *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus è un batterio Gram-positivo, anaerobio facoltativo. Risulta citocromo, ossidoenzimasi e catalasi-negativo, non genera spore e privo di motilità. È un batterio termofilo (temperatura ottimale di crescita tra 37-42°C), omofermentante, resistente ai trattamenti di termizzazione e pastorizzazione (62°C per 20-30 min.). Le dimensioni del genoma sono di 1.8 Mb (Delorme et al., 2008). Il genere *Streptococcus* comprende diverse specie patogene nocive per l'uomo, come *Streptococcus pyogenes* o *Streptococcus pneumoniae*, insieme ad una singola specie *S. thermophilus*. Data la sua innocua natura “*Generally Recognized As Safe*”, e le sue caratteristiche questo batterio è uno dei più importanti usati nella fabbricazione dei prodotti lattiero-caseari (Bolotin et al., 2004). Viene essenzialmente usato come starter insieme ad alcuni *Lactobacilli* e il suo ruolo principale è la produzione di acido lattico dal lattosio. Viene utilizzato anche come probiotico: allevia infatti i sintomi dell'intolleranza al lattosio e altri disordini gastrointestinali (Siezen et al., 2004). L'accesso ai genomi completamente sequenziati di *S. thermophilus* (LMD-9, LMG-18311, CNRZ-1066) ha consentito una migliore comprensione della storia evolutiva di questa specie, che appartiene a un genere che comprende numerose specie patogene. *S. thermophilus* sembra essere una specie emersa di recente, tuttavia, la presenza di numerosi pseudogeni suggerisce anche un processo continuo di evoluzione regressiva verso una forma batterica specializzata dedicato alla crescita nel latte. Lo studio *in silico* del suo metabolismo cellulare e della sua regolazione ha dimostrato che l'evoluzione ha dato forma al genoma di *S. thermophilus* tramite selezione per la crescita ottimale in questa ben definita nicchia ecologica (Bolotin et al., 2004). In particolare, *S. thermophilus* ha mantenuto un metabolismo dell'azoto ben sviluppato mentre il suo catabolismo degli zuccheri è fortemente degenerato. Inoltre *S. thermophilus* condivide la sua nicchia ecologica con altri LAB

come *Lactobacillus bulgaricus*, con conseguente specifica cooperazione metabolica, che è dimostrato sia dal mantenimento di specifici *pathways* o sia dalla perdita di importanti funzioni metaboliche fornite dal *partner* simbiotico (Hols et al. 2005).

Inoltre, *S. thermophilus* ha perso molte funzioni legate alla virulenza comuni tra gli streptococchi patogeni e che giocano importanti ruoli nella adesione cellulare, nei sistemi di invasione o di fuga dal suo sistema immunitario. Anche se è evidente una sorta di “decadimento” genetico nel genoma di *S. thermophilus*, numerose piccole “*genomics islands*” sembrano essere state acquisite tramite LGT (Bolotin et al., 2004).

Queste regioni codificano una serie di importanti tratti fenotipici industriali, come la biosintesi dei polisaccaridi, la produzione batteriocine (*blp*, *lab*). Nel complesso, la sua ristretta nicchia ecologica e la sua corrispondente evoluzione adattiva può probabilmente spiegare la crescita molto rapida di *S. thermophilus* nel latte (Hols et al., 2005).

1.2 Batteriocine e loro regolazione

Le batteriocine sono molecole batteriche prodotte sia da Gram negativi che Gram positivi e hanno un'attività inibitoria verso i ceppi diversi dal produttore. Si tratta di un'ampia gamma di proteine con diverse dimensioni, strutture chimiche, *target*, modalità d'azione e meccanismi immunitari indotti. Vengono prodotte dal 99% delle specie batteriche. Quelle prodotte dai Gram negativi sono ad elevato peso molecolare con uno specifico dominio per l'adesione, la traslocazione e l'attacco. Quelle prodotte dai Gram positivi sono peptidi cationici di piccole dimensioni e termostabili, inizialmente sintetizzati come pre-peptidi che poi vengono scisse in molecole biologicamente attive. Nei Gram negativi sono a localizzazione plasmidica, mentre nei Gram positivi sono localizzati sia a livello plasmidico che a livello cromosomico. Vengono prodotte spontaneamente o tramite una stimolazione operata da agenti

ambientali chimici e fisici. I geni coinvolti sono organizzati in strutture multigeniche ad operone. Il corredo genetico deputato alla produzione è più ampio nei Gram positivi. Sono disponibili molti studi sulla regolazione delle batteriocine prodotte dai batteri lattici ma si sa relativamente poco sulle batteriocine di *Streptococcus thermophilus*. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, nei Gram positivi le batteriocine sono membrana attive e non c'è un assorbimento specifico, non si esclude una via di assorbimento preferenziale per quelle specifiche batteriocine caratterizzate da uno spettro d'azione più limitato. Nei Gram negativi invece, penetrano attraverso canali ionici a livello della membrana citoplasmatica e una volta penetrate mostrano attività nucleasica. In questo caso le cellule sensibili presentano dei recettori. In generale, i Gram negativi sono attivi verso i Gram negativi, mentre, i Gram positivi sono attivi sia verso i Gram positivi che verso i negativi. Il range di sensibilità può aumentare in base al pH e in base alle sostanze chimiche. A livello regolatorio, nei Gram positivi è presente uno specifico sistema di regolazione, mentre nei Gram negativi sono presenti diversi sistemi di regolazione. In entrambi i casi risulta di particolare rilevanza un sistema di regolazione denominato *quorum sensing*, tale sistema risulta influenzato dalla densità cellulare presente nel substrato. Si stabilisce una sorta di network di comunicazione tra cellula e cellula basata su fattori solubili che spesso determinano la formazione di biofilm microbici. Le batteriocine prodotte dai LAB sono state suddivise da Kleanhammer in tre classi, a cui se ne aggiunge una quarta attualmente poco nota. Le tre classi sono rappresentate da: lantibiotici (classe I), batteriocine di classe II, batteriolisine (classe III). I lantibiotici sono piccoli peptidi contenenti lantionina e sono classificati in base alla loro struttura e modalità d'azione. Alcuni creano pori nella membrana portando a dissipazione del potenziale, altri agiscono attraverso inibizione enzimatica. Le batteriocine di classe II sono piccoli peptidi stabili al calore. La maggior parte è attiva inducendo una permeabilizzazione di membrana con conseguente

dispersione delle molecole dai batteri *target*. Molti raggruppamenti sono stati proposti ma la loro natura eterogenea rende difficile una classificazione razionale, comunemente divise in IIa e IIb. Le batteriocine di classe III sono proteine di notevoli dimensioni e termolabili. Le batteriocine di classe IV sono molecole complesse nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica. Per quanto riguarda il ruolo ecologico c'è un coinvolgimento sia a livello difensivo (impedisce l'invasione ad opera di altri ceppi/specie batteriche nell'habitat) che offensivo (strategie invasive e stanziamento in una particolare nicchia). C'è un interesse clinico (si parla di potenziali farmaci d'elezione, con un ristretto campo d'azione, es. Latticina 3147 prodotta da *Lactococcus lactis* per la mastite bovina) e anche un interesse alimentare (come bioconservanti). Le uniche batteriocine usate in campo alimentare sono quelle prodotte dai batteri lattici. Nel 1988 la FDA ha approvato la nisina prodotta da *Lactococcus lactis* (Jack et al., 1995). I LAB hanno caratteristiche che li rendono ideali per essere usati come bioperservanti. Le batteriocine sono riconosciute come sostanze sicure, non sono attive verso le cellule eucariotiche. Hanno uno spettro d'azione relativamente stretto (verso patogeni deterioranti e patogeni). Hanno una modalità d'azione battericida (di solito verso la membrana citoplasmatica batterica). Il fatto che i determinanti genetici abbiano localizzazione plasmidica facilita la manipolazione genetica (Hols et al., 2005). L'utilizzo di batteriocine nella preservazione degli alimenti è dovuta quindi alla capacità di aumentare la *shelf-life* dei prodotti, diminuire la trasmissione di patogeni lungo la catena alimentare e migliorare le perdite economiche per deterioramento di cibo. Il loro utilizzo porta ad una diminuzione di preservanti chimici e permette di usare trattamenti termici meno severi. Sono in aumento le richieste di cibi "*minimally processed*", freschi, "*ready-to-eat*", funzionali e nutraceutici. Queste richieste, almeno in parte, potrebbero essere soddisfatte dall'uso di batteriocine. Possono essere aggiunte direttamente e prodotte ex-situ oppure, possono essere aggiunte in condizioni che favoriscono la loro

produzione in situ (Mucchetti 2006).

1.3 *Quorum-sensing*

E' presente sia nei Gram negativi che nei Gram positivi e permette la regolazione a livello di popolazione di un grande numero di tratti, compresi competenza, virulenza, e risposta allo stress. Lavori recenti collegano il *quorum-sensing* anche alla motilità, alla produzione di EPS, alla formazione di biofilm e alla produzione di tossine. La comunicazione intraspecifica è comune, mentre per quanto riguarda la comunicazione interspecifica ci sono pochi esempi e la maggior parte non sono legati alla microbiologia alimentare. Un esempio è stato mostrato nei biofilm dentali tra *Streptococcus gordonii* e *Veillonella atypica*. Un esempio di comunicazione interspecifica si ha con *Lactobacillus plantarum* NCB (Keller et al., 2006). C'è un'espressione genica coordinata ottenuta dalla produzione, rilascio, rilevamento di piccole molecole segnale chiamate autoinduttori. A basse densità di popolazioni c'è un'espressione basale di molecole autoinduttrici che diffondono fuori dalla cellula e sono immediatamente diluite nell'ambiente circostante. Un aumento della popolazione batterica risulta in un accumulo di autoinduttori dentro e attorno alla cellula. L'autoinduttore attiva in modo specifico una proteina regolatore trascrizionale legandosi a questa. I regolatori attivati interagiscono con sequenze *target* e aumentano o bloccano la trascrizione dei geni del *quorum-sensing*. Esempi di autoinduttori sono: gli acilomoserinalattoni, gli autoinduttori₂, dipeptidi ciclici (Gobbetti et al., 2007). Il sistema di trasduzione del segnale e la regolazione dei geni corrispondenti è generalmente considerato come il principale meccanismo di adattamento dei batteri ai cambiamenti ambientali. Recentemente, una ricerca approfondita sulle proteine regolatorie presenti in 145 genomi procarioti ha portato alla classificazione delle proteine regolatrici come membri di “sistemi ad un componente” (*OCSs*, ad esempio, i

regolatori di trascrizione) o di “sistemi a due componenti” (*TCS*). Sulla base di tale classificazione, *S. thermophilus* contiene 81 *OCSs* e 10 *TCSs*. I *TCS* Svolgono un ruolo chiave in importanti caratteristiche fisiologiche come la virulenza, la competenza naturale, la produzione di batteriocine, la formazione di biofilm, la risposta allo stress, e molte altre risposte adattative. Essi sono normalmente costituiti da un “sensore” o proteina istidina chinasi (*HK, hk*) e un “effettore” o regolatore di risposta (*RR, rr*); i geni che codificano queste proteine sono in genere geneticamente vicini e trascritti come un operone. Nove dei *TCS* codificati da *S. thermophilus* mostrano questa tipica organizzazione genetica *HK* e *RR*. I *TCS* di *S. thermophilus* sono stati numerati secondo la loro presenza nei genomi di LMG18311 e CNRZ1066. Quattro dei 20 geni *TCS* in *S.thermophilus* (*rr03, hk03, hk10* e *rr11*) sono pseudogeni. È interessante notare che il *TCS03* non funzionale di *S. thermophilus* è molto simile al *TCS* di *S. pneumoniae*, che è coinvolto nella regolazione della virulenza e lo sviluppo delle competenze naturale. Nel complesso, *S. thermophilus* sembra codificare otto *TCS* completi e potenzialmente funzionali. Tutte le sequenze dei genomi disponibili *S. thermophilus* (LMG-18311, CNRZ-1066 e LMD-9) codificano questi *TCS* e questi sistemi sono praticamente identici nei tre ceppi (Hols et al., 2005).

1.4 Batteriocine in *Streptococcus thermophilus* e locus *blp*

È interessante notare che le sequenze dei genomi di *S. thermophilus* disponibili contengono due *loci* che sono coinvolti nella produzione di batteriocine. Il primo di questi *loci* è designato *lab* (per lantibiotico) e contiene geni che assomigliano a geni che di solito si trovano in *loci* coinvolti nella produzione di lantibiotici. Il locus *lab* di *S.thermophilus* è stato probabilmente acquisito attraverso LGT (*lateral gene transfert*). Tuttavia, le dimensioni estremamente ridotte della porzione matura del lantibiotico

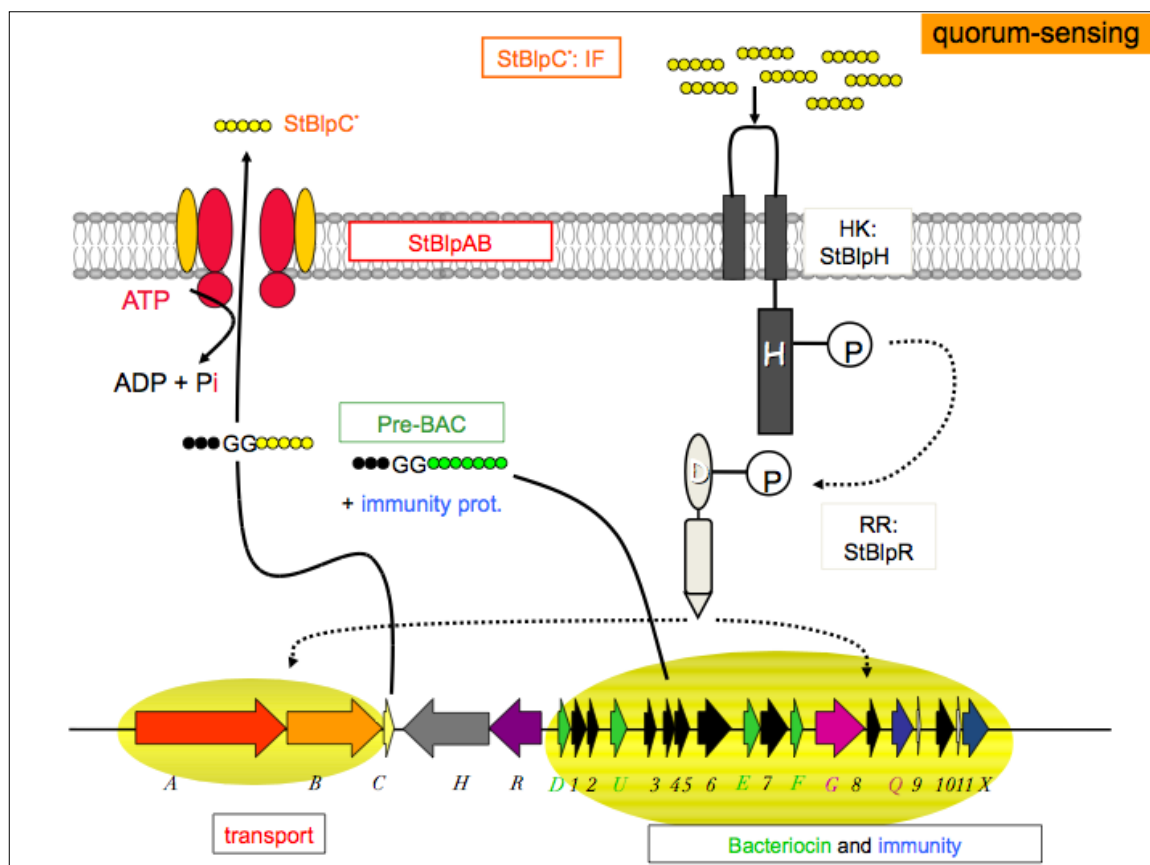
(labA), che è composto solo di 9 residui, solleva dubbi sul fatto che questo *locus* sia effettivamente coinvolto nella produzione di un lantibiotico funzionale. Inoltre, i geni che codificano per il trasportatore ABC e che sono coinvolti nel trasporto del lantibiotico sembrano non essere presenti nel *locus lab* di *S. thermophilus*. Il secondo di questi *loci* mostra le caratteristiche tipiche di un *locus* per batteriocine di classe II e ricorda molto una parte del *locus blp* (*bacteriocin-like-peptide*) di *S. pneumoniae* ed è quindi indicato come il *locus blp* di *S. thermophilus* (*blp_{St}*). Un *locus* simile è stato anche trovato in *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus equi* (Hols et al., 2005).

Tra i ceppi di *S. thermophilus*, LMD-9 mostra il *locus* più complesso. Come nel caso della produzione di molte batteriocine prodotte dai LAB, l'attività antimicrobica di *S. thermophilus* legata al *locus blp_{St}* è regolata a livello trascrizionale da un meccanismo a *quorum-sensing*. Il feromone precursore BlpC_{St} è processato a valle di un motivo con una doppia glicina e sviene ecreto attraverso un apparato specifico di trasporto ABC consistente nel trasportatore BlpA_{St} e nella proteina accessoria BlpB_{St}. Le forme processate di BlpC_{St} (D9C-30 [30 aminoacidi (aa)] e D9C-19 [19 aa]) attivano un sistema a cascata che coinvolge il sistema a due componenti BlpH_{St}/BlpR_{St} e che attiva la trascrizione dei geni strutturali per le batteriocine e per l'immunità. Questi geni sono organizzati in tre operoni (*blpD_{St}-orf2*, *blpU_{St}-orf3*, e *blpE_{St}-blpF_{St}*) e ciascuno comprende geni per ipotetiche batteriocine (chiamati geni *bac_{St}*) e geni *orf*. I quattro peptidi Bac_{St}, BlpD_{St}, BlpU_{St}, BlpE_{St} e BlpF_{St} contengono una doppia glicina, sito che probabilmente viene scisso durante la secrezione attraverso il sistema di trasporto BlpAB_{St}. Tuttavia, le funzioni individuali e le loro interazioni come batteriocine multipeptidi rimangono ipotetiche. BlpH_{St} e blpR_{St} codificano proteine simili ad istidina-chinasi e regolatori di risposta, rispettivamente, e blpC_{St} codifica per il

precursore IF che contiene il sito con la doppia-glicina. Il *cluster* genico *blpSt* codifica per un potenziale trasportatore ABC, per batteriocina/IF (*blpASt*, *blpCSt*) e per una proteina accessoria del trasportatore (*blpBSt*) che viene troncata nei ceppi LMG18311 e CNRZ1066. Il *cluster* include un numero variabile di geni per peptidi simili a batteriocine contenenti il sito con le due glicine: *blpDSt*, *blpUSt*, *blpESt* e *blpFSt* in LMD-9, *blpKSt* in CNRZ1066, *blpUSt* e *blpK'St* (pseudogene) in LMG18311. (Fontaine et al., 2008; Fontaine et al., 2007).

Figura 6: Locus *blp* in *S. thermophilus* LMD-9 e regolazione tramite *quorum-sensing*

(Fontaine 2009, dati personali)



2. OBIETTIVO

La presenza dei LAB nel formaggio è importante sia per le caratteristiche organolettiche che per la *shelf-life* del prodotto finale, sono infatti in grado di produrre peptidi antimicrobici (batteriocine). Da settembre 2008 ad aprile 2009 parte della mia tesi di dottorato è stata svolta presso il Dipartimento di Genetica dell'Università Cattolica di Louvain-la-Neuve (Belgio). Il progetto ha riguardato la caratterizzazione genetica e funzionale del locus *blp* per la produzione delle batteriocine in diversi ceppi di *Streptococcus thermophilus*. I geni codificanti per i peptidi antimicrobici e per l'immunità sono organizzati in un operone. È stata valutata la diversità genetica di questo operone in ceppi di *Streptococcus thermophilus* tramite sequenziamento del DNA. Inoltre sono stati svolti studi di inibizione su piastra per caratterizzare i ceppi a livello funzionale. Si è trattato di uno studio di tipo evolutivo per cercare di comprendere come il locus *blp* si sia evoluto tra i vari ceppi di *Streptococcus thermophilus*.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi di *Streptococcus thermophilus*

Le analisi sono state eseguite sui seguenti campioni: 23 ceppi industriali di *S. thermophilus*, 2 ceppi artigianali di *S. thermophilus* (isolati dal Montasio D.O.P. dai colleghi dell'Università degli Studi di Udine) e un controllo negativo (LMD-9 mutante con l'intero *locus blp* deleto). I 23 ceppi industriali sono i seguenti: 7773, 7854, 7891, 7785, 7796, LMG-18311, CNRZ-1066, LMD-9, 7853, 782, Sfi16, LMG-7952, 7984, 7879, ST18, LMG-7953, CNRZ-368, AO54, ST11, 7666, 7790, 7694 e 7710.

S. thermophilus è stato fatto crescere anaerobicamente (*BBL GasPak systems*; *Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ*) in brodo M17 (*Difco Laboratories Inc., Detroit, MI*) con 1% (wt/vol) di lattosio a 42°C.

3.2 Studi funzionali

Per valutare la funzionalità dei ceppi di *Streptococcus thermophilus* nel produrre batteriocine, sono stati eseguiti due tipologie di saggi con la metodica “*spot-on-lown*” e con il metodo “*multi-layer*”.

Le analisi sono state eseguite su 23 ceppi industriali di *Streptococcus thermophilus*, su due ceppi di *Streptococcus thermophilus* isolati dal formaggio Montasio D.O.P. e sul ceppo di *Streptococcus thermophilus* LMD-9 geneticamente modificato in cui è stato deleto l'intero *locus blp* (Δblp).

Per entrambi i test la forma sintetica matura del peptide BlpC_{St}, che si chiama D9C-30 (H₂N-SGWMDYINGFLKGFGGQRTLPTKDYNIPQA-COOH) (purezza > 95%), è stata ottenuta da *Sigma-Genosys (Sigma-Genosys Ltd., Haverhill, United Kingdom)*.

Tutti i test sono stati eseguiti con e senza peptide sintetico. Ogni ceppo è stato testato come “produttore” e come “indicatore”.

3.2.1 Metodo “spot-on-lawn”

Culture *over-night* del ceppo “produttore” sono state diluite 100 volte in brodo M17L e incubate anaerobicamente a 42°C. Alla densità ottica (OD₆₀₀) di 0.1, il peptide sintetico D9C-30 è stato aggiunto alla concentrazione finale di 400 ng/ml, e le colture sono state incubate per 2 ore fino alla OD₆₀₀ di 1.6. Piccoli volumi (10 µl) delle colture indotte sono state aggiunte ad uno strato di 6 ml di *soft agar* M17G (0.8% *agar*) contenente 10⁸ CFU del “ceppo indicatore”. Le piastre sono state incubate anaerobicamente a 42°C o.n. prima dell'analisi delle zone di inibizione che circondano le cellule produttrici.

3.2.2 Metodo “multi-layers”

Culture *over-night* del “ceppo produttore” di *S. thermophilus* sono stati diluite 100 volte in brodo fresco M17L e incubate anaerobicamente a 42°C. Alla OD₆₀₀ of 1.0, 100 µl di coltura è stata diluita 10⁶ volte in 6 ml di *soft agar* M17L preriscaldato (0.8% *agar*) e versato uniformemente in una piastra petri contenente uno strato di supporto di 25 ml di agar solido M17L (2% *agar*). Un altro strato di 6 ml di *soft agar* M17L contenente 400 ng/ml D9C-30 è stato versato sullo strato di agar contenente le cellule produttrici. E' stato poi aggiunto un terzo strato di 6 ml di *soft agar* contenente 10⁸ CFU del “ceppo indicatore”. Le piastre sono state incubate per 10 ore prima dell'analisi dell'inibizione.

3.3 Analisi della diversità genetica del locus *blp*

Per studiare la variabilità genetica nel locus *blp* di *Streptococcus thermophilus* sono state eseguite delle PCR *end-point* che permettevano di valutare la struttura e la dimensione del locus *blp* nei diversi ceppi. PCR di “*screening*” sono state eseguite per amplificare diverse parti del locus *blp* implicate nel sistema di trasporto, nel sistema di regolazione, nella produzione delle batteriocine e nell'immunità (*blpABC*, *blpRH*,

blpbac e *blpGIX*) Tutti i *primer* utilizzati nei diversi saggi di PCR sono stati disegnati sulla sequenza del *locus blp* di *Streptococcus thermophilus* LMD-9 di cui è disponibile il genoma completo. Le analisi sono state eseguite su tutti i ceppi descritti nel paragrafo 3.1. In tutti gli esperimenti LMD-9, LMG-18311 e CNRZ-1066 sono stati usati come controlli interni mentre LMD-9 Δblp è stato usato come controllo negativo. Il DNA di ciascun campione di *Streptococcus thermophilus* è stato amplificato utilizzando PCR *touch-down* con il seguente ciclo termico: 98°C per 30", 98°C per 10", 56°C per 30", 72°C per 20" (16 cicli), 98°C per 15", 45°C per 30", 72°C per 20" (19 cicli), 72°C per 7'. La mix di reazione contiene *primer* 1 μ M ciascuno, 0,4 mM dNTPs, *High-Fidelity DNA Polymerases Buffer 1X*, *Taq Phusion (Finnzymes, Finland)* in un volume finale di 20 μ l. Alla mix di reazione è stata aggiunta una colonia prelevata direttamente dalla piastra Petri oppure venivano aggiunti 2 μ l di soluzione acquosa in cui precedentemente era stata stemperata una colonia. La reazione è stata eseguita utilizzando il termociclatore *PCR system 2400 (Applied Biosystems, Lennik, Belgium)*. I campioni amplificati sono stati caricati e analizzati in gel di agarosio 1,8%. Per il sequenziamento del *locus blp* sono stati disegnati dei *primer* interni alla sequenza di interesse in modo tale da sequenziare frammenti lunghi circa 400 bp che si sovrapponevano tra loro a livello delle estremità. Gli amplificati sono stati purificati tramite *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)*, valutati quantitativamente al *Nanodrop*. 80-100 ng di PCR assieme a 3 μ l di *primer* 15 pmol/ μ l sono stati inviati presso il centro di sequenziamento del Dipartimento di Biologia dell' Università' UCL di Louvain-la-Neuve. Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate utilizzando i *software* *CONTIGExpress*, *CloneManager*, *VectorNTI* e *AlignX*. L'assemblaggio della sequenza completa di ciascun ceppo è stato eseguito mediante ricerca delle sovrapposizioni tra i singoli frammenti. In pratica la presenza di sequenze identiche, o notevolmente simili su diverse decine di basi nelle estremità consente di identificare coppie di frammenti consecutivi. Per *blpbac*

e *blpGIX* si è proceduto con la metodica dei “*primer walking*”: ottenuta la sequenza di un frammento della parte del *locus* di interesse, su essa si disegnano nuovi *primer* che si appaiano (con una ventina di basi) all'estremità del frammento. Si procede così fino a quando tutto il segmento di interesse viene sequenziato.

4. RISULTATI

4.1 Studi funzionali

La capacità dei ceppi di *Streptococcus thermophilus* a produrre batteriocine è stata indagata attraverso il test “*spot-on-lawn*” su piastra di agar.

In questi saggi sono stati misurati i raggi degli aloni di inibizione attorno al ceppo produttore nelle piastre di agar. Ciascun ceppo è stato utilizzato sia come ceppo “produttore” (la sua capacità inibitoria è stata testata su tutti gli altri ceppi), che come ceppo “indicatore” (su di esso sono stati testati tutti i ceppi).

Si sono riscontrate differenze nell'alone di inibizione, in quanto il raggio attorno al ceppo produttore variava da 1,5 mm a 9 mm. La grandezza dell'alone di inibizione dipende, oltre che dal ceppo usato come produttore, anche dal ceppo indicatore. Ad esempio Sfi16, uno dei ceppi maggiormente produttori, mostrava chiaramente una diversa capacità inibitoria utilizzando diversi ceppi “indicatori”. Usando come ceppo “indicatore” il 7666 si è ottenuto un alone di 9 mm, usando invece come “indicatore” il ceppo AO54 si otteneva un alone di 2 mm.

8 ceppi si sono dimostrati funzionali e quindi capaci di produrre batteriocine. I ceppi identificati come “produttori” con il test “*spot-on-lawn*” sono stati: Sfi16, LMD9, 7952, 7853, AO54, 782, 7891, 7854. Ogni test è stato eseguito aggiungendo o meno il peptide D9C-30 al ceppo potenzialmente “produttore”.

L'azione inibitoria può essere potenziata o meno con l'aggiunta del peptide. Il ceppo 7952, senza peptide, creava un alone di 7 mm di raggio mentre col peptide, determinava un alone di 9 mm di raggio. Per il ceppo Sfi16 invece, la potenza inibitoria non veniva aumentata dall'aggiunta del peptide esogeno.

Il metodo di inibizione “*multi-layers*” è stato usato per confermare i risultati trovati con la metodica “*spot-on-lawn*”. I dati ottenuti con le due metodiche sono risultati concordanti.

I ceppi di *Streptococcus thermophilus* isolati dal Montasio D.O.P. non hanno mostrato alcun potere inibitorio nei confronti degli altri ceppi studiati, ma quando venivano usati come ceppi “indicatori” si riscontravano differenze interessanti negli aloni di inibizione. I ceppi maggiormente produttori di batteriocine su di essi creavano aloni di inibizione più piccoli rispetto a quelli creati usando come “indicatori” i ceppi industriali.

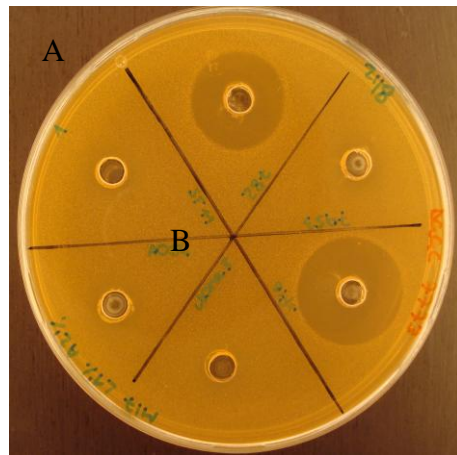


Figura 1: Ceppo indicatore 7773

(A): ceppo produttore Sfi-16

(B): ceppo produttore 782

4.2 Analisi della diversità genetica del locus *blp*

Una prima fase del lavoro ha riguardato un' “analisi generale” della struttura, della lunghezza e quindi della complessità del locus *blp* nei diversi ceppi di *Streptococcus thermophilus*. I primer sono stati disegnati sulle sequenze del genoma completo di LMD-9 fiancheggiando i diversi geni costituenti il locus *blp*. Le taglie degli ampliconi ottenuti con le diverse PCR (vedi paragrafo 3.3) e visualizzate sul gel di agarosio sono state comparate con quelle di LMD-9 di cui sono note le sequenze esatte (controllo interno). In LMD-9 il locus presenta queste dimensioni: 7542 bp (*blpbac*), 4143 bp (*blpGIX*), 4106 bp (*blpABC*), 2518 bp (*blpRH*) e 3055 bp (*blpGIX*).

Per il ceppo 782 non è stato possibile ottenere amplificazione tramite PCR per alcuna parte del *locus blp*. In tutti i ceppi, gli ampliconi di *blpABCe blpRH* ottenuti, presentavano una lunghezza di circa 4000 *bp* e 2500 *bp* rispettivamente. Per *blpGIX* e *blpbac*, erano invece presenti, nei vari ceppi, ampliconi di lunghezze variabili: da 800 *bp* a 3500 *bp*. Sono state eseguite PCR anche per vedere la presenza o meno di sequenze di inserzione (IS), 18 ceppi sono risultati positivi per la loro presenza.

Dopo una prima fase di “*screening*” generale, si è deciso di sequenziare il *locus blp* in tutti i ceppi. Le sequenze di frammenti di circa 400 *bp* in formato FASTA sono state assemblate utilizzando il *software ContigExpress*. In questo modo è stato possibile visualizzare tutte le differenze tra le sequenze, sia come differenze nel numero e nel tipo di base nucleotidica. Per i geni implicati nel sistema di trasporto ABC (*blpA*, *blpB*, *blpC*) è stato possibile ottenere le sequenze complete per tutti i ceppi. Per quanto riguarda la parte del *locus* implicata nella produzione delle batteriocine e dell'immunità i risultati del sequenziamento non sono ancora disponibili. In linea generale si può dire che i ceppi di *Streptococcus thermophilus* studiati, in base alla complessità rilevata in questa parte del *locus*, si possono riunire in tre gruppi. Per quanto riguarda i risultati ottenuti dall'analisi del complesso genico *blpRH* si è potuto vedere che il ceppo 7853 è identico a LMD-9, 7952 è molto simile a LMD-9 mentre il ceppo Sfi-16 presenta molte differenze rispetto a LMD-9. La proteina BlpA è risultata costituita da 717 aa in gran parte dei ceppi ma, tra essi, sono state riscontrate mutazioni puntiformi. In 3 ceppi (7710, 7953 e 7984) sono state rilevate mutazioni non senso e le proteine sono risultate di 200 aa (7710) e 427 aa (7953, 7984). Per quanto riguarda BlpB i ceppi analizzati si possono dividere in due gruppi, il primo è caratterizzato da *full-length* di 455 aa mentre l'altro gruppo è costituito da quattro ceppi (7666, 7773, LMG18311, CNRZ1066) che presentano mutazioni non senso con una lunghezza di 111 aa anziché 455 aa. Per quanto riguarda *blpC* in tutti i ceppi la proteina è risultata lunga 53 aa, e l'unica differenza

riscontrata tra i ceppi è l'ultimo residuo aminoacidico: può esserci una valina oppure un'alanina. Tutti i ceppi risultati produttori di batteriocine presentano l'alanina come residuo terminale nella proteina blpC. Sono stati analizzati anche due ceppi di *Streptococcus thermophilus* isolati dal formaggio Montasio ma le analisi delle sequenze devono ancora essere terminate.

5. DISCUSSIONE

Le batteriocine sono sostanze antimicrobiche dotate di un elevato potenziale applicativo in ambito sia biomedico che alimentare. Risulta, pertanto, fondamentale e necessario approfondire le ricerche per comprendere sempre più a fondo le caratteristiche intrinseche di queste molecole.

In questo lavoro sono stati studiati ceppi “industriali” e “artigianali” di *Streptococcus thermophilus* sia a livello funzionale che genetico per la produzione di batteriocine. Per gli studi funzionali si è valutata la capacità inibitoria (misurata come alone di inibizione su piastra di agar) del ceppo “produttore” nei confronti del ceppo usato come “indicatore”. Sono state rilevati ceppi produttori e non produttori e tra i produttori ceppi più o meno attivi. La maggior parte dei ceppi analizzati sembra aver perso la capacità fenotipica di produrre batteriocine. Si è visto inoltre che la grandezza dell'alone di inibizione dipendeva, oltre che dal ceppo usato come “produttore”, anche dal ceppo “indicatore”. Il ceppo Sfi-16, che si è dimostrato il ceppo a più elevata capacità inibitoria, ha prodotto aloni di diversa grandezza in base al ceppo usato come indicatore. Sembra quindi esserci una sorta di “sistema di difesa” nel ceppo utilizzato come “indicatore” nei confronti del ceppo “produttore” di batteriocine. Inoltre in questo studio è stato studiato il *locus* genico per la produzione delle batteriocine di *Streptococcus thermophilus* a livello molecolare. Questo *locus* comprende geni che codificano per un trasportatore ABC (*blpA*) e una proteina accessoria (*blpB*) coinvolti nel trasporto e nel processamento della batteriocina, e il tipico modulo di regolazione a *quorum-sensing* composto di un sistema a due componenti (*blpH* e *blpR*; TCS09) e il corrispondente peptide precursore induttore (*blpC*). Per quanto riguarda *blpbac* e *blpGIX* in generale ci sono stati problemi di resa di amplificazione iniziale (poco prodotto di PCR) e ci sono state difficoltà nel sequenziamento. Evidentemente la sequenza al suo interno è molto diversa dalla sequenza di LMD-9 sulla quale fin

dall'inizio sono stati disegnati i *primer* e quindi per queste parti del *locus* si è dovuto procedere con la metodica del sequenziamento con *primer walking*. In linea generale si può dire che dall'analisi di *blpbac* e *blpGIX* sembrano esserci tre gruppi di ceppi che mimano la complessità genetica dei tre ceppi di riferimento completamente sequenziati (LMD9, CNRZ1066 e LMG1831). LMD9 presenta il *locus* più complesso e contiene i geni *blpD*, *blpU*, *blpE*, *blpF*; LMG18311 presenta i geni *blpU*, *blpK* e, invece, in CNRZ1066 è presente solo il gene *blpK* (Fontaine et al., 2007). Interessante notare che i ceppi con le strutture più semplici in termini di lunghezza, e quindi di geni presenti, sono anche quelli meno funzionali nei test delle batteriocine. *BlpABC* e *blpHR* sono stati completamente sequenziati in tutti ceppi analizzati in questo studio. Per sequenziare queste parti del *locus* è stato necessario procedere col sequenziamento di piccoli frammenti e il loro assemblaggio ha permesso di ricostruire la sequenza completa. In *blpABC* sono state riscontrate mutazioni puntiformi e in particolare come sostituzione di basi (mutazioni sinonime, mutazioni di senso errato e mutazioni nonsense) e mutazioni *frameshift*. Interessante notare che i ceppi che nella proteina *blpC* presentano come ultimo residuo l'aminoacido alanina sono anche le specie più attive dalle analisi funzionali. Il ceppo 782 è risultato ceppo produttore di batteriocine, ma purtroppo non è stato possibile studiarlo a livello genetico. Non è stato possibile amplificare alcun frammento del *locus blp* di questo ceppo, sembrerebbe quindi che questo *locus* non sia presente. Saranno necessari ulteriori studi per comprendere quale sia la zona del genoma di questo ceppo che è implicata nella produzione di sostanze antimicrobiche. Gli otto ceppi risultati funzionali (Sfi-16, LMD-9, 7952, 7853, AO54, 782, 7891, 7854) sono simili a livello della sequenza nucleotidica *blpA*. Interessante notare che in Sfi-16 ci sono molte differenze rispetto alla sequenza di LMD9 per quanto riguarda *blpRH* e da sottolineare che tra questi due ceppi ci sono sostanziali differenze anche nei test funzionali. Per LMD9 l'aggiunta del peptide esogeno è necessaria per

l'azione inibitoria di questo ceppo (senza peptide aggiunto non c'è inibizione), mentre per Sfi-16 non c'è alcun cambiamento con o senza il peptide.

6. CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati studiati ceppi di *Streptococcus thermophilus* sia a livello funzionale che genetico per la produzione di batteriocine. Dai risultati ottenuti si è potuto concludere che la maggior parte dei ceppi analizzati ha perso le capacità fenotipiche a produrre batteriocine e presenta inoltre un'elevata variabilità all'interno del locus *blp*. Dal confronto tra i ceppi sono state riscontrate mutazioni puntiformi tra cui mutazioni non senso. La presenza di sequenze altamente simili a monte (*blpRHS*) e a valle (*blpGS*) dei moduli batteriocine-immunità e la presenza di una sequenza altamente conservata tra le regioni del promotore di tutti gli operoni *bacSt* suggerisce un meccanismo di plasticità per i loci *blpSt* con acquisto/perdita di moduli tramite ricombinazione omologa. La presenza di elementi di inserzione nelle sequenze della maggior parte dei ceppi analizzati potrebbe giocare un ruolo in questo processo, sono state ipotizzate forme di trasposizione e ricombinazione. In generale, c'è una grande variabilità genetica tra i ceppi e quindi, si può concludere che, tra i ceppi di *Streptococcus thermophilus* studiati, c'è una forma di bassa competizione. La produzione di batteriocine implica, evidentemente, una spesa in termini di energia che non è certamente di beneficio per la cellula batterica. Potrebbe essere interessante ricreare sperimentalmente le “condizioni di non competitività” e analizzare le varie generazioni di un ceppo puro nel tempo. In questo modo si potrebbero ipoteticamente generare ceppi mutanti incapaci di produrre batteriocine.

BIBLIOGRAFIA

Abee, T., L. Krockel, and C. Hill. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol.* **28**:169-85.

Abee, T., W. Van Schaik, and R.J. Siezen. 2004. Impact of genomics on microbial food safety. *Trends Biotechnol.* **22**:653-60.

Andrighetto, C., P. De Dea, A. Lombardi, E. Neviani, L. Rossetti, and G. Giraffa. 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res Microbiol.* **149**:631-43.

Aquilanti, L., G. Silvestri, E. Zannini, A. Osimani, S. Santarelli, and F. Clementi. 2007. Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *J Appl Microbiol.* **103**:948-60.

Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.T. Brennan, and T.M. Cogan. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal.* **11**: 259-274.

Garrity G.M. 2005. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (Parts A, B & C; ThreeVolume Set)", published by Williams & Wilkins.

Bilhère, E., P.M. Lucas, O. Claisse, and A. Lonvaud-Funel. 2009. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Appl Environ Microbiol.* **75(5)**:1291-300.

Bodilis, J., M. Hedde, N. Orange, and S. Barry. 2006. OprF polymorphism as a *marker* of ecological niche in Pseudomonas. Environ Microbiol. **8**:1544-5.

Bolotin A, B. Quinquis, P. Renault, A. Sorokin, S.D. Ehrlich, S. Kulakauskas, A. Lapidus, E. Goltsman, M. Mazur, G.D. Pusch, M. Fonstein, R. Overbeek, N. Kyprides, B. Purnelle, D. Prozzi, K. Ngui, D. Masuy, F. Hancy, S. Burteau, M. Boutry, J. Delcour, A. Goffeau, and P. Hols. 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus. Nat Biotechnol. **22(12)**:1554-8.

Bury, D., P. Jelen, and K. Kimura. 1998. Whey protein concentrate as a nutrient supplement for lactic acid bacteria. International Dairy Journal. **8**:149-151.

Cai, H., B.T. Rodríguez, W. Zhang, J.R. Broadbent, and J.L. Steele. 2007. Genotypic and phenotypic characterization of Lactobacillus casei strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. Microbiology. **153**:2655-65.

Calmin G., F. Lefort, and L. Belbahri. Multi-locus sequence typing (MLST) for two lacto-acid bacteria (LAB) species: Pediococcus parvulus and P. damnosus. 2008. Mol Biotechnol. **40(2)**:170-9.

Cardazzo, B., E. Negrisolo, L. Carraro, L. Alberghini, T. Patarnello, and V. Giaccone. 2007. Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in Bacillus cereus food-borne isolates. Appl Environ Microbiol. **74**:850-60.

Citterio, B., M. Manzano, M. Maifreni, and G. Rondinini. 1995. Some microbiological aspects of the Montasio cheese production. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*. **46**:7-19.

Cocolin, L., V. Pepe, F. Comitini, G. Comi, and M. Ciani. 2004. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Res.* **5(3)**:237-45.

Collado, M.C., S. Delgado, A. Maldonado, and J.M. Rodríguez. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative *real-time* PCR. *Lett Appl Microbiol.* **48**:523-8.

Coppola, S., G. Blaiotta, D. Ercolini, and G. Moschetti. 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* **90**:414–20.

Dale, J.W., and M. Schantz. 2004. *Dai geni ai genomi*. Milano. EdiSES. 143-159.

De Felip, G. 2001. *Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti*. Milano : Tecniche nuove. 264-280.

De Las Rivas, B., A. Marcobal, and R. Muñoz. 2006. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology.* **152**:85-93.

Delbes, C., A.M. Leila, and M.C. Montel. 2007. Monitoring Bacterial Communities in

Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Appl Environ Microbiol.* **73**:1882-91.

Delorme C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int J Food Microbiol.* **126(3)**:274-7.

Dolci P., A. Barmaz, S. Zenato, R. Pramotton, V. Alessandria, L. Cocolin, K. Rantsiou, and R. Ambrosoli. 2009. Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *J Appl Microbiol.* **106(1)**:278-87.

Ercolini, D., G. Moschetti, G. Blaiotta, and S. Coppola. 2001. The potential of a polyphasic PCR-dGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst Appl Microbiol.* **24(4)**:610-7.

Fitts, R., M. Diamond, C. Hamilton, and M. Neri. 1983. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Appl Environ Microbiol.* **46(5)**:1146-51.

Fontaine, L., and P. Hols. 2008. The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG(St), a thiol-disulfide oxidase. *Appl Environ Microbiol.* **74(4)**:1102-10.

Fontaine, L., C. Boutry, E. Guédon, A. Guillot, M. Ibrahim, B. Grossiord, and P.

Hols. 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* **189(20)**:7195-205.

Frahm, E., and U. Obst. 2003. Application of the fluorogenic probe technique (*Taqman* PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J Microbiol Methods.* **52**:123-31.

Franciosi, E., L. Settanni, A. Cavazza, and E. Poznanski. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal.* **19**:3-11.

Gardini, F., R. Tofalo, N. Belletti, L. Iucci, G. Suzzi, S. Torriani, M.E. Guerzoni, and R. Lanciotti. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.* 2006. **23(7)**:641-8.

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* **88**:215-22.

Giraffa, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev.* **28(2)**:251-60.

Giraffa, G., and E. Neviani. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int J Food Microbiol.* **67(1-2)**:19-34.

Gobbetti, M., M. De Angelis, R. Di Cagno, F. Minervini, and A. Limitone. 2007. Cell-cell communication in food related bacteria. *Int J Food Microbiol.* **120(1-2):**34-45.

He, J.W., and S. Jiang. 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by *real-time* PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* **71:**2250–55.

Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P. Renault, and M. Kleerebezem. 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* **29(3):**435-63.

Innocente, N., and C. Corradini. 1996. Effect of ripening temperature on the maturation of Montasio cheese. *Ital. J. Food Sci.* **53:** 291-302.

Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* **59(2):**171-200.

Keller, L., and M.G. Surette. 2006. Communication in bacteria: an evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol.* **4(4):**249-58.

Klappenbach, J.A., J.M. Dunbar, and T.M. Schmidt. 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:**1328–1333.

Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte, and G. Reuter. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. 1998. *Int J Food Microbiol.* **41(2)**:103-25.

Kirk, J.L., L.A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J.N. Klironomos, H. Lee, and J.T. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods.* **58**:169-88.

Klaenhammer, T.R., R. Barrangou, B.L. Buck, M.A. Azcarate-Peril and, E. Altermann. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* **29(3)**:393-409.

Kleerebezem. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**:1579–1596.

Lau, S., and W. Liu. 2007. Recent Advances In Molecular Techniques for the Detection of Phylogenetic *marker* and Functional Genes in Microbial communities. *FEMS Microbiology Letters* **275**: 183-190.

Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* **63(11)**:4516-22.

Lopitz-Otsoa, F., A. Rementeria, N. Elguezabal and, J. Garaizar. 2006. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol.* **23(2)**:67-74.

Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Baldwin, H.D. Lee, I. Díaz-Muñiz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, G. Saier, M. Klaenhammer, T. Richardson, .. Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103(42):**15611-6.

Makarova KS, Koonin EV. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol.***189(4):**1199-208.

Marco, M.L., and H.J.M Wells-Bennik. 2008. Impact of bacterial genomics on determining quality and safety in the dairy production chain. *International Dairy Journal* **18:**486–495.

Marilley, L., M.G. Casey. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int J Food Microbiol.* **90(2):**139-59.

Marino, M., Maifreni M., and Rondinini G., 2003. Microbiological Characterization of Artisanal Montasio Cheese: Analysis of Its Indigenous Lactis Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* **229:**133-140.

Martín-Platero, A.M., E. Valdivia, M. Maqueda, I. Martín-Sánchez and M.

Martínez-Bueno. 2008. Polyphasic approach to bacterial dynamics during the ripening of Spanish farmhouse cheese, using culture-dependent and -independent methods. *Appl Environ Microbiol.* **18**:5662-73.

Meroth, C.B., W.P. Hammes and C. Hertel. 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **69(12)**:7453-61.

MiPAF. 2006. “Valorizzazione e salvaguardia della microflora lattica autoctona presente in formaggi tradizionali italiani”. *Sci Tecn Latt-Cas.* **57(5)**:301-308.

Mohania, D., R. Nagpal, M. Kumar, A. Bhardwaj, M. Yadav, S. Jain, F. Marotta, V. Singh, O. Parkash, and H.J. Yadav. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Dig Dis.* **9(4)**:190-8.

Monnet, C., V. Ulvé, A.S. Sarthou, and F. Irlinger. 2008. Extraction of RNA from cheese without prior separation of microbial cells. *Appl Environ Microbiol.* **74**:5724-30.

Mora D., M.G. Fortina, C. Parini, G. Ricci, M. Gatti, G. Giraffa and P.L.

Manachini. 2002. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J Appl Microbiol.* **93(2)**:278-87.

Moschetti, G., G. Blaiotta, M. Aponte, P. Catzeddu, F. Villani, P. Deiana, and S. Coppola. 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *J Appl Microbiol.* **85(1)**:25-36.

Mucchetti, G., and Neviani E. 2006. Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia qualità e sicurezza. Milano. Tecniche Nuove. 145-167, 499.

Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N. Hunter, and N.A. Jacques. 2009. Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by *real-time* PCR. FEMS Microbiol Lett. **296**:45-51.

Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jacques, and N. Hunter. 2002. Determination of bacterial load by *real-time* PCR using a broad-range (universal) probe and *primer* set. Microbiology. **148**:257-66.

Nandy S.K., P.M. Bapat, and K.V. Venkates. 2007. Sporulating bacteria prefers predation to cannibalism in mixed cultures, FEBS letters. 1:151-156.

Nocker, A., M. Burr, and K. Camper. 2007. Genotypic microbial community proling: a critical technical review. Microbial Ecology. **54**: 276-289.

Ogier, J.C., and P. Serror. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. International Journal of Food Microbiology. **126**:291–301.

Pérez Pulido, R., N. Ben Omar, H. Abriouel, R. Lucas López, M. Martínez Cañamero, and A. Gálvez. 2005. Microbiological study of lactic acid fermentation of Caper berries by molecular and culture-dependent methods. Appl Environ Microbiol. **71(12)**:7872-9.

Pfeiler, A.E., and T.R. Klaenhammer. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *TRENDS in Microbiology*. **15**:12.

Poznanski, E., A. Cavazza, F. Cappa, P.S. Cocconcelli. 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *Int J Food Microbiol*. **92(2)**:141-51.

Jany, J.L., and G. Barbier. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*. **25**:839–848.

Jensen, M.A., J.A. Webster, and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol*. **59**:945 – 952.

Rainey, F.A., D. Fritze, and E. Stackebrandt. 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett*. **115(2-3)**:205-11.

Randazzo, C.L., C. Caggia, and E. Neviani. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J Microbiol Methods*. **78(1)**:1-9.

Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D. Akkermans, W.M. De Vos, E.E. Vaughan. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol*. **68(4)**:1882-92.

Rantsiou K., R. Urso, L. Iacumin, C. Cantoni, P. Cattaneo, G. Comi G, and L. Cocolin. 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl Environ Microbiol.* **71(4):**1977-86.

Riesenfeld, C.S., P.D. Schloss, and J. Handelsman. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. 2004. *Annu Rev Genet.* **38:**525-52.

Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* **245(2):**154-60.

Serhan, M., C. Cailliez-Grimal, F. Borges, A.M. Revol-Junelles, C. Hosri, J. Fanni. 2009. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol.* **26:**645-52.

Siezen, R.J., F.H. Van Enckevort, M. Kleerebezem, and B. Teusink. 2004. Genome data mining of lactic acid bacteria: the impact of bioinformatics. *Curr Opin Biotechnol.* **15(2):**105-15.

Sieuwerts, S., F.A. De Bok, J. Hugenholtz, and J.E. Van Hylckama Vlieg. 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl Environ Microbiol.* **74(16):**4997-5007.

Thompson, J.D., D.G. Higging, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-80.

Topisirovic, L., M. Kojic, D. Fira, N. Golic, I. Strahinic, and J. Lozo. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* **112**:230-5.

Tremonte, P., M. Succi, A. Reale, T. Di Renzo, E. Sorrentino, and R. Coppola. 2007. Interactions between strains of *Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 743-5.

Tsakalidou, E., E. Zoidou, B. Pot, L. Wassill, W. Ludwig, L.A. Devriese, G. Kalantzopoulos, K.H. Schleifer, and K. Kersters. 1998. Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* **2**:519-27.

Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y.H. Rogers, H.O. Smith. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. 2004. *Science.* **304(5667)**:66-74.

Zago, M., B. Bonvini, D. Carminati, G. Giraffa. 2009. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by *real-time* PCR. *Syst Appl Microbiol.* **32**:514-21.

Zambonelli, C. 2001. *Microbiologia degli alimenti fermentati.* Bologna. Calderini Edagricole. 3, 33-34, 98-102.

SITI WEB:

N.C.B.I. (BLAST): www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

NEBcutter2: tools.neb.com/NEBcutter2

Ribosomal Database Project: rdp.cme.msu.edu

RIFERIMENTI NORMATIVI

D.P.R. 10 marzo 1986. Riconoscimento della denominazione di origine del formaggio tipico “Montasio”. G.U. n. 258 del 6/11/1986.

D.P.R. 30 ottobre 1955 n. 1269. Riconoscimento delle denominazioni circa i metodi di lavorazione, caratteristiche merceologiche e zone di produzione dei formaggi.

Comunità Europea. G.U.C.E. n. 148 del 21/06/96 del Reg. CE n. 1107/96 del 12/06/96.