

Tesi di Dottorato di Elena Colombo

**STUDIO DELLE COMUNITA' MICROBICHE IN FORMAGGI
DI CAPRA A PRODUZIONE ARTIGIANALE**

A.A. 2008-2009

1. INTRODUZIONE

1.1 CENNI STORICI SULL'ALLEVAMENTO CAPRINO

L'allevamento caprino ha origini antichissime. Numerosi reperti archeologici, molteplici riferimenti nella letteratura e nella mitologia greca testimoniano che la capra è l'animale di più antica domesticazione. Le sue virtù sono state conosciute ed apprezzate da Assiri, Babilonesi, Fenici, Egizi fino agli Etruschi ed ai Romani.

Nello stesso tempo però l'allevamento della capra in Italia ha sempre mostrato una forte discontinuità in termini numerici e di apprezzamento da parte di allevatori e consumatori.

In epoca romana la capra era tenuta in grande considerazione ed i suoi prodotti (carne, latte e pellame) erano molto apprezzati, più che quelli vaccini ed ovini. In questo periodo l'attento sistema di allevamento di questa specie porta a modificazioni nella morfologia della capra, che assume una taglia maggiore. D'altro canto però nel periodo romano si verifica uno spostamento dell'attenzione dalla capra alla pecora, per il ruolo assunto dalla lana nel sistema economico e produttivo. Con la caduta dell'Impero romano (476 d.C.), si assiste ad una forte diminuzione dell'allevamento caprino e le capre vengono in genere allevate in greggi di pecore. Con le invasioni barbariche questa situazione peggiora ulteriormente a causa dell'insicurezza negli spostamenti che non consente di praticare la transumanza, il sistema di allevamento allora più diffuso.

Nel basso Medioevo (1000-1492 d.C.) e negli anni successivi, si assiste ad una messa a coltura delle campagne con aumento dei seminativi, dei pascoli erbacei e delle bonifiche. In questo periodo la produzione della lana riacquista la sua importanza e la transumanza viene regolamentata e tutelata con aumento delle terre dedicate al pascolo a scapito dell'agricoltura. La capra non viene più considerata di utilità sociale e si assiste ad una graduale riduzione dello spazio disponibile per il suo allevamento. Durante l'alto medioevo vennero rafforzati i divieti atti a limitare o proibire il pascolo delle capre su terreni destinati a semina dai grandi feudi.

Nei primi anni del XIX secolo è iniziata quella che viene poi definita "guerra alle capre" e che tornerà con vigore anche durante il ventennio fascista. L'inizio dell'ottocento vede forti cambiamenti a livello sociale ed economico a vantaggio dello sviluppo della proprietà privata e della nascente industria. L'allevamento caprino subisce in questo periodo una forte contrazione numerica per favorire l'allevamento più redditizio di bovini e ovini. La capra viene inoltre ancora una volta accusata di rovinare siepi, campi, giardini ed orti, di facilitare le frane, di distruggere i boschi e di trasmettere all'uomo malattie.

Dopo un periodo di espansione dell'allevamento caprino la guerra alle capre torna durante il ventennio fascista con l'emissione di due provvedimenti: il primo prevedeva l'esclusione del pascolo da tutte le aree boschive anche di proprietà dell'allevatore (Regio Decreto Legislativo del 30/12/1923), il secondo introduceva la "tassa sulle capre" (Regio Decreto del 16/01/1927), una tassa onerosa da versare per ogni capo posseduto che ebbe l'effetto di falciare drasticamente il patrimonio caprino italiano.

Durante la guerra e nell'immediato dopoguerra l'allevamento caprino vede una leggera ripresa ma, all'inizio degli anni '70 (boom economico ed esodo rurale), si ha un nuovo forte crollo di questo tipo di allevamento. Dalla seconda metà circa degli anni '70 si assiste ad una graduale e costante ripresa ed aumento del numero di allevamenti e di capre allevate grazie alla riscoperta delle potenzialità di questo tipo di allevamento che può essere condotto sia in modo estensivo in aree montane o caratterizzate da pascoli poveri sia in modo intensivo con razze altamente selezionate (1).

1.2 L'ALLEVAMENTO CAPRINO: PROSPETTIVE E MERCATO

1.2.1 LA SITUAZIONE MONDIALE

L'attuale consistenza del patrimonio caprino mondiale viene calcolata in oltre 738 milioni di capi. Rispetto a dieci anni fa la quantità di bestiame caprino ha fatto registrare un incremento medio annuo approssimativamente uguale al 2.5% che diventa di poco superiore al 3% se si riferisce al trentennio 1971/2001. Sotto questo profilo la capra ha mostrato un comportamento nettamente differente dalle principali specie d'interesse zootecnico. Nel corso degli ultimi trent'anni nessun altro tra i principali animali d'interesse zootecnico ha, infatti, rilevato una crescita numerica altrettanto consistente: mentre i caprini sono quasi raddoppiati, i suini sono aumentati del 38%, i bovini solo del 18% e gli ovini sono addirittura diminuiti del 2% (2).

Quest'imponente espansione non è stata tuttavia accompagnata da una redistribuzione geografica dell'allevamento. La caprinicoltura continua infatti ad essere praticata prevalentemente nei continenti asiatico ed africano e a risultare assai meno presente in quello europeo e americano.

Negli ultimi vent'anni, a seguito dell'ormai inesorabile e drammatica distinzione tra paesi sviluppati e paesi in via di sviluppo (pvs), si può facilmente verificare come la zootecnia caprina rafforzi la sua presenza nel secondo tipo di paesi, tanto da poter ragionevolmente affermare che essa continua a rimanere una prerogativa pressoché esclusiva dei pvs. Inoltre la capra è una specie che si presta più di altre allo sfruttamento delle aree marginali le quali sono notoriamente e drammaticamente assai più abbondanti nei paesi meno sviluppati che non in quelli economicamente più progrediti (2).

Le produzioni caprine utilizzate a fini alimentari sono la carne e il latte. Nel 2001 la produzione mondiale di carne ha quasi raggiunto i 3.8 milioni di tonnellate mentre quella lattea ha superato i 12 milioni (2). Rispetto a dieci anni prima l'offerta di carne risulta accresciuta del 38% e quella di latte del 24% (2).

La ripartizione geografica dell'allevamento sopra descritta si riflette evidentemente sulla distribuzione territoriale delle produzioni. Sia per la carne sia per il latte, infatti, i continenti asiatico e africano rappresentano le aree di maggiore concentrazione. Tuttavia è importante sottolineare come nel caso del latte caprino l'Europa occupi una posizione di relativa importanza poichè in essa è concentrato quasi un quinto della produzione mondiale.

Buona parte di tali produzioni sono prevalentemente destinate al consumo locale, in particolare, nel caso della carne, il grado di apertura del settore che è dato dal rapporto tra il totale degli scambi (importazioni più esportazioni) e il totale della produzione mondiale, è stato nel 2000 pari a solo all'1.3%. Nel caso del latte non si dispone di dati ufficiali ma si ha ragione di ritenere che la consistenza del commercio internazionale sia egualmente bassa anche a causa dei maggiori problemi di trasporto e commercializzazione dovuti all'alta deperibilità di questo prodotto (3).

1.2.2 LA SITUAZIONE EUROPEA

In Europa l'allevamento caprino si presenta come una sorta di prerogativa pressoché esclusiva dell'area mediterranea: dei quasi 18 milioni di capi presenti nel vecchio continente al 2001 quasi 13 milioni (70% del totale) sono infatti allevati in nazioni europee che ricadono in quest'area. Nell'Unione Europea le nazioni con il maggior patrimonio caprino risultano essere la Grecia e la Spagna nelle quali è complessivamente ubicato poco meno della metà del patrimonio continentale (2).

Sul piano delle produzioni la leadership dell'UE è più marcata sul fronte della carne che non su quello del latte. In particolare Spagna e Portogallo evidenziano un maggior orientamento verso la caprinicoltura da carne piuttosto che verso quella da latte; il contrario avviene invece per Francia, Spagna, Grecia, Bulgaria e Italia.

In alcuni paesi europei la capra ha già da tempo imboccato la strada dell'imprenditorialità. Nel periodo 2000-2002 Francia, Grecia e Spagna vantano le maggiori produzioni infatti si collocano ai primi tre posti per produzione di latte caprino, la prima con 530.000 ton, la seconda e la terza a pari merito con 450.000 ton (2) seguite da Bulgaria e Italia con circa 100.000 ton (2) (Figura 1). Gli ultimi rilevamenti del 2003 (3) evidenziano che la produzione di latte caprino è aumentata in Italia ed in Francia mentre ha registrato un netto calo in Portogallo e, in misura minore, in Spagna.

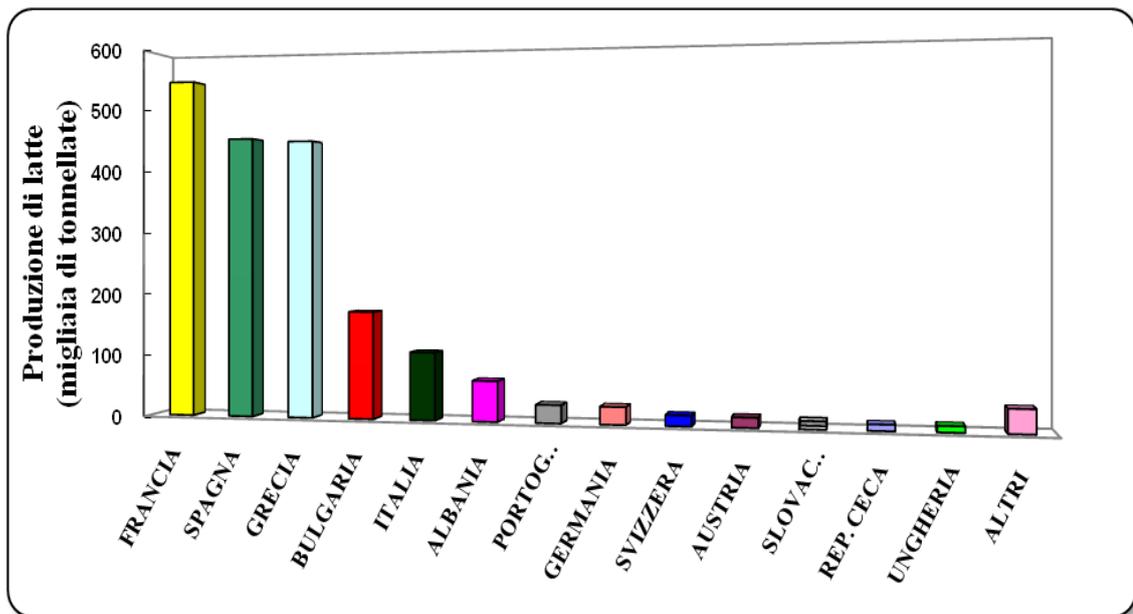


Figura 1: Produzione di latte caprino nei principali Paesi Europei (FAO, 2004)

Sebbene non riportata nelle precedenti considerazioni merita di essere menzionata tra le principali aree di interesse caprino quella alpina (Svizzera e Austria soprattutto) dove, come noto, questo tipo di allevamento può contare su antichissime tradizioni.

Relativamente agli scambi l'Europa partecipa piuttosto considerevolmente al peraltro modesto commercio internazionale dei prodotti caprini: i paesi europei nel 2001 hanno coperto approssimativamente il 12% delle quasi 23 mila tonnellate di export mondiale di prodotti caprini (2).

1.2.3 LA SITUAZIONE ITALIANA

L'Italia, come si è appena osservato, rappresenta uno dei paesi europei dove la specie caprina è maggiormente rappresentata. Con oltre 1 milione e 300 mila capi, il nostro paese occupa infatti il terzo posto dopo Grecia e Spagna nella graduatoria delle nazioni UE in cui è praticato questo tipo di allevamento (2).

Da qualche anno la consistenza del bestiame caprino risulta relativamente stabile. Il dato sopra citato di 1.3 milioni di capi rappresenta il risultato massimo di un processo di espansione che ha raggiunto il suo picco nel corso degli anni ottanta.

In questo decennio, infatti, causa soprattutto le crisi attraversate dal settore bovino ed ovino, prevalentemente e rispettivamente riconducibili all'introduzione del regime delle quote e alle difficoltà di collocamento dei formaggi ovinii sui mercati internazionali, non pochi allevatori hanno scelto di puntare nuovamente sulla capra.

Attualmente tale spinta espansiva pare esaurita. Non è tuttavia da escludere una sua ripresa di vigore soprattutto qualora persistano i disagi prodotti nel comparto bovino a seguito delle vicende della BSE ed in quello ovino dalla verosimile riduzione delle esportazioni casearie come conseguenza del recente e forte apprezzamento dell'euro sul dollaro.

Tradizionalmente l'allevamento caprino italiano è prevalentemente concentrato nel Mezzogiorno. Oltre l'80% dei capi è infatti allevato nei territori meridionali ed insulari della penisola con Sardegna, Sicilia e Calabria che da sole ospitano il 58% di tutti i caprini nazionali (2). Nel tempo, tuttavia, si nota un processo di riallocazione geografica dell'allevamento. Per quanto il predominio del meridione rimanga tutt'ora schiacciante gli ultimi anni hanno portato il settentrione d'Italia a crescere più intensamente del sud, così che, attualmente, ben il 13% delle capre si trova allevato nel nord d'Italia contro appena un 6% agli inizi degli anni settanta (2). Tale fenomeno non può che essere valutato positivamente in relazione alle prospettive di sviluppo dell'intero comparto. Nel nord del Paese si ritrovano condizioni strutturali e infrastrutturali più idonee ad accrescere l'efficienza dei processi produttivi; un ambiente economico certamente più competitivo ma, allo stesso tempo, assai più stimolante; una tipologia di consumatore più ricco e complessivamente meglio disposto ad acquistare prodotti "particolari" quali indubbiamente sono quelli caprini.

Si è già detto che la zootecnia caprina italiana è prevalentemente orientata verso la produzione del latte e assai meno verso quella della carne. Nel 2006 gli allevamenti italiani hanno prodotto 170 mila quintali di latte, cui vanno aggiunti i 92 mila quintali destinati all'alimentazione dei capretti (2). La Figura 2 riporta la produzione di latte caprino per singola regione italiana.

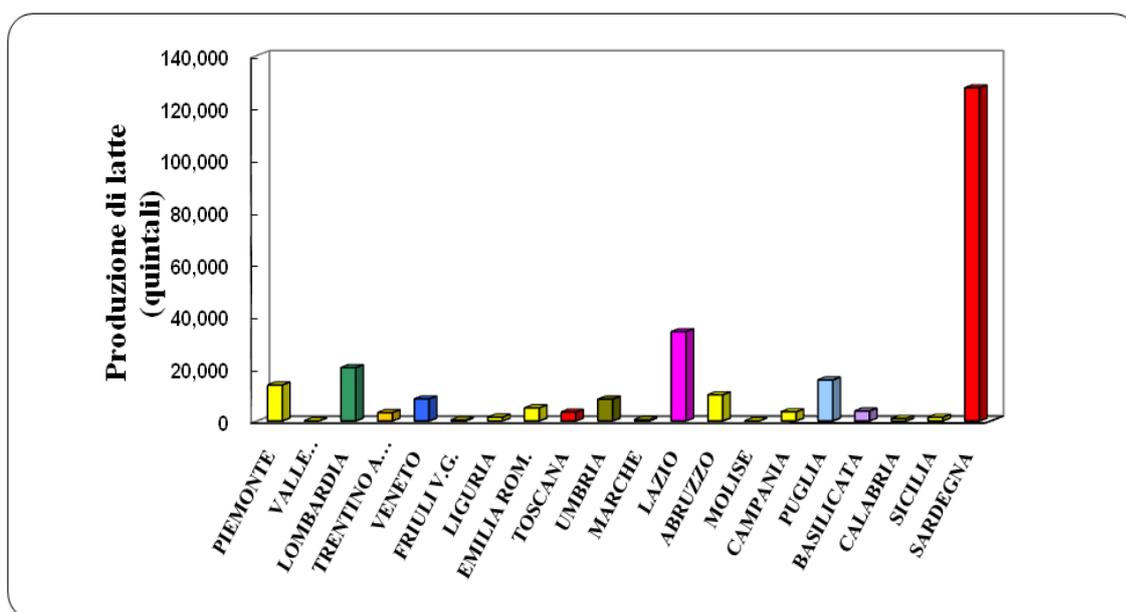


Figura 2: Produzione di latte per regione italiana (ISTAT, 2006)

Si può osservare dalla Figura 2 che il 62% della produzione nazionale di latte caprino è concentrata al sud, il 20% al centro e il 18% al nord d'Italia (2).

Relativamente ai rapporti con l'estero, si ha ragione di ritenere che questi siano assai blandi per quanto attiene il latte e, più in generale, le produzioni lattiero casearie. Si può infatti ipotizzare che l'interscambio di latte sia frenato dalla modestia dei volumi trattabili e dai noti problemi di deperibilità, mentre quello dei latticini non assume particolare rilevanza dato il carattere prevalentemente locale che contraddistingue il consumo di questi prodotti in Italia.

1.3 LE AZIENDE AGRICOLE CAPRINE E IL SISTEMA D'ALLEVAMENTO

Secondo l'ultima rilevazione effettuata dall'ISTAT nel 2006 sulla "Struttura e produzione delle aziende agricole italiane", nell'allevamento caprino sarebbero coinvolte circa 60 mila imprese, cioè poco meno del 3% delle unità che compongono il tessuto produttivo dell'agricoltura italiana. Rispetto agli inizi degli anni '90 il numero di aziende con caprini risulta sensibilmente contratto (-35%), mentre quello dei capi allevati manifesta una sensibile crescita (+11%). La concomitanza di questi due eventi si riflette positivamente sull'ampiezza media degli allevamenti nazionali, che passa, da 14 a 23 capi per azienda (2).

Sebbene tale espansione sia da valutare in maniera positiva, costituendo il necessario presupposto alla creazione di unità più efficienti e competitive, non si può tuttavia non constatare, quanto irrisoria risulti essere la consistenza degli allevamenti caprini in Italia. Seppure medio, e in quanto tale celante al suo interno di singoli casi assai diversificati, il dato di cui sopra costituisce un'equivocabile indicazione delle difficoltà strutturali e quindi economiche del comparto caprino.

Come è facile comprendere una così vasta polverizzazione del comparto rende estremamente problematico garantire un impiego dei fattori produttivi che sia pienamente efficiente. Ciò si riflette sulla remunerazione dei fattori medesimi e, quindi, sull'economicità complessiva dell'allevamento. Inoltre va aggiunto che le ridotte dimensioni riducono fortemente la propensione delle imprese ad indurre innovazioni tecnologiche. Queste o sono eccessivamente costose, taluni macchinari o gli stessi animali geneticamente selezionati possono rientrare in questo novero, o sono particolarmente complesse per poter essere accessibili ad imprese troppo piccole.

Alla contenuta ampiezza numerica dei capi allevati corrisponde una dotazione terriera ugualmente limitata. Al 1999 risulta infatti che il 70% circa delle aziende che allevano caprini presenta una superficie agricola utilizzata (SAU) che non supera i 10 ettari (2).

Il quadro strutturale è ulteriormente aggravato dal fatto che nell'allevamento caprino, più che in quello di altre specie, permane tutt'ora assai consistente il ricorso all'uso di terre appartenenti ad istituzioni pubbliche. Sempre con riferimento al 1999, quasi il 9% delle aziende dedite alla zootecnia caprina risulta infatti privo di terreno agrario, contro un dato nazionale riferito alla

totalità delle imprese praticanti l'allevamento animale calcolato nell'ordine del 3% circa. Il ricorso all'uso di terre pubbliche, pur consentendo l'esercizio dell'attività zootecnica in aree che non potrebbero essere altrimenti valorizzate ed ad imprese che diversamente non avrebbero motivo di esistere, rafforza l'immagine di una zootecnia caprina tuttora pensata come attività di sussistenza o, al più, complementare ad imprese più importanti. È infatti evidente come in tali condizioni si accentui il problema della precarietà della base terriera che rappresenta uno dei principali caratteri negativi dell'allevamento caprino. Precarietà della base terriera che a sua volta conduce a bassi investimenti fondiari e, quindi, ad altrettanto modesti livelli di produttività della terra.

Questo fenomeno appare particolarmente evidente nel mezzogiorno del Paese, mentre risulta meno accentuato al nord, dove invece prevale un tipo di allevamento più stanziale. Con l'evidente esclusione del bestiame, il capitale di scorta appare generalmente scarso. In particolare, nel caso delle macchine e delle attrezzature o si ha che fare con imprese poco o niente provviste di un proprio parco mezzi, o si riscontrano casi in cui esso risulta sovradimensionato in alcune componenti, in particolar modo quelle rappresentate dalle macchine motrici, e carente in altre, quali macchine operatrici, mungitrici meccaniche, refrigeratori, ecc. Estremamente limitate si rilevano anche le risorse finanziarie destinate alla copertura delle anticipazioni di esercizio. Ne discende che le imprese caprine italiane risultano generalmente caratterizzate da un basso livello di capitalizzazione. Ciò costituisce un fatto grave di per se stesso, in quanto pregiudica l'efficienza dei processi produttivi e la possibilità, attraverso l'accantonamento dei profitti, di promuovere l'adozione di adeguate innovazioni tecnologiche. La scarsa dotazione di capitali propri, ed in modo particolare di capitali indifferenziati, induce inoltre un uso distorto della leva creditizia. Nelle suddette condizioni il ricorso al finanziamento esterno non viene utilizzato per sostenere un preciso progetto di sviluppo aziendale ma, all'opposto, è quasi integralmente assorbito dalle rilevanti esigenze di gestione.

1.4 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL LATTE CAPRINO

Il latte di capra si presenta di colore bianco-opaco in quanto in esso vi è assenza di carotenoidi e con sapore leggermente dolciastro (4 e 5).

La composizione media del latte caprino è mostrata nella Tabella 3 (Fonte INRAN). La sostanza secca nella quale sono rappresentati in ordine decrescente, zuccheri, grassi, proteine, ceneri e altri costituenti minori rappresenta il 10-13%.

| | |
|-----------------|----------------|
| ACQUA | 86,3 g |
| PROTEINE | 3,9 g |
| LIPIDI | 4,8 g |
| CARBOIDRATI | 4,7 g |
| ENERGIA | 76 kcal 320 kJ |
| SODIO | 40 mg |
| POTASSIO | 180 mg |
| FERRO | 0,1 mg |
| CALCIO | 141 mg |
| FOSFORO | 106 mg |
| TIAMINA | 0,05 mg |
| NIACINA | 0,30 mg |
| RIBOFLAVINA | 0,11 mg |
| VIT. A ret. eq. | 86 mcg |
| VIT. C | 1 mg |

Tabella 3: Composizione media del latte caprino per 100 g di prodotto (INRAN).

PROTEINE

Il latte di capra è una fonte importante di proteine di eccellente qualità, le quali contengono tutti gli amminoacidi essenziali in proporzione soddisfacente per un buon utilizzo da parte dell'organismo. Grazie ad un valore biologico molto elevato ed un buon coefficiente di utilizzazione digestiva, le proteine del latte di capra hanno un'ottima efficacia nutrizionale e possono soddisfare una buona parte della richiesta giornaliera in proteine di una persona adulta. Le sostanze proteiche del latte caprino si distinguono in coagulabili (70-80%) e non coagulabili (20-30%). Le proteine coagulabili sono costituite dalle caseine, mentre quelle non coagulabili lattealbumine, lattoglobuline, peptidi e azoto non proteico. Il contenuto delle singole frazioni è influenzato dall'alimentazione, dallo stadio di lattazione, da fattori ambientali e dalla razza. In particolare le proteine del latte caprino presentano una grande diversità individuale legata ad un

polimorfismo genetico molto marcato nella caseina, che determina variazioni quali - quantitative notevoli (6). Indagini elettroforetiche e cromatografiche, della componente proteica del latte di capra è stata individuata la presenza di frazioni diverse nelle caseine e nelle sieroproteine rispetto al latte vaccino. Quattro sono le frazioni caseiniche individuate nel latte caprino: α S1, α S2, β e K (7). Di particolare interesse è il rapporto α S1/ α S2 che è quasi sempre inferiore a 1; più elevato risulta essere il contenuto medio della caseina β e K sempre confrontate con le rispettive frazioni presenti nel latte vaccino. Il basso contenuto di caseina α S1, mentre da una parte consente di ottenere formaggi poco suscettibili di prendere sapore amaro, provoca dall'altra, effetti importanti sui processi di coagulazione (7). La proporzione delle diverse frazioni caseiniche è all'origine di differenze osservate nel comportamento alla coagulazione di latti individuali. In realtà la caseina del latte di capra non si discosta dal modello strutturale delle micelle di caseina del latte vaccino ma, nonostante ciò, si rilevano comportamenti caseari nettamente differenti. Anche a parità di contenuti in caseina, i coaguli ottenuti dal latte di capra sono meno consistenti; il coagulo si forma più rapidamente, ma i tempi di rassodamento sono superiori. La causa può essere attribuita al fatto che la α S1 rallenta la formazione del coagulo, sequestrando ioni di calcio e rendendolo, in tal modo, non disponibile per la formazione del precipitato di paracaseinato di calcio (8 e 9).

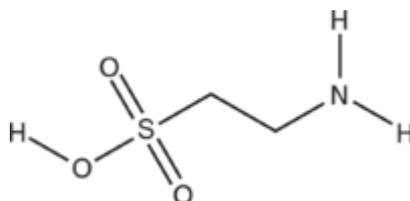
La debole consistenza della cagliata è la causa principale della minor versatilità casearia del latte di capra, delle maggiori difficoltà di trattamento meccanico e di perdita nella lavorazione.

TAURINA

La taurina (Figura 4a) è un prodotto di sintesi degli amminoacidi solforati cisteina e metionina presente nell'organismo animale. Il latte materno ne possiede un tenore alto, pari a 4,2 mg/100 ml. Il latte vaccino ne contiene soltanto 0,24 mg/100 ml. Come si osserva nella Figura 4b, il latte di capra ne contiene ancor più del latte materno, ovvero 4,5 mg/100g (9).

La taurina sembra svolgere una funzione importante quale fattore di crescita e sviluppo del cervello dei neonati, anche se in letteratura esistono controverse valutazioni rispetto a questa molecola, prodotta comunque naturalmente dall'organismo stesso.

Figura 4a: Formula di struttura della taurina.



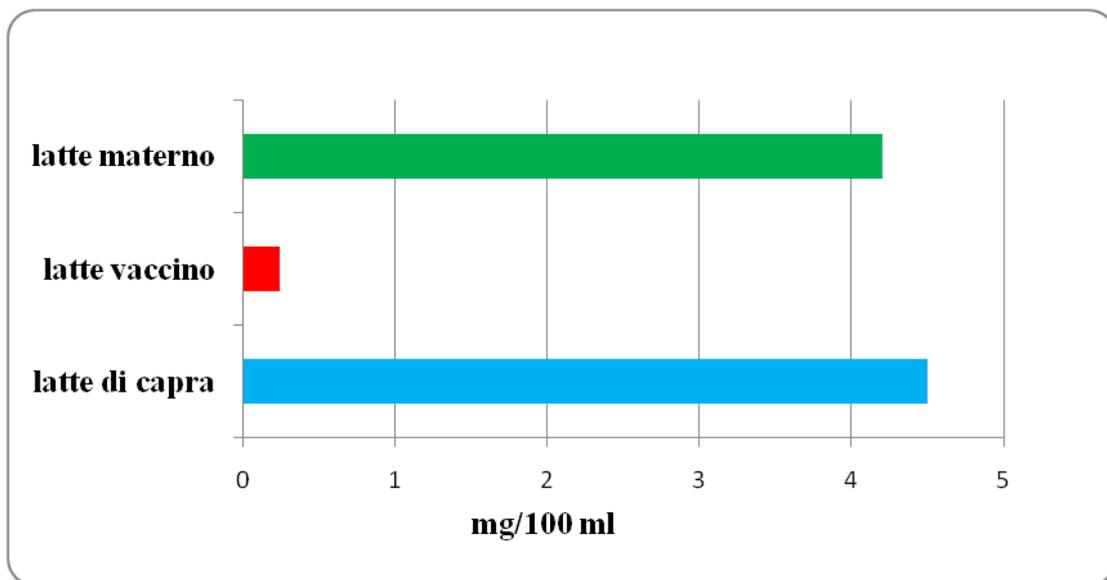


Figura 4b: Livelli di taurina (DFE, 2007).

GLUCIDI

Il componente più rappresentativo è il lattosio. Esso non viene assorbito tale quale dalla mucosa intestinale, ma è idrolizzato dalla lattasi intestinale che lo trasforma in glucosio e galattosio; il suo apporto in galattosio è importante per lo sviluppo del sistema nervoso centrale. Parte del lattosio viene fermentato dalla flora intestinale che lo trasforma in acidi grassi a corta catena, pronti per essere utilizzati come fonte energetica.

Il lattosio ai fini tecnologici della caseificazione non ha importanza in quanto finisce per la quasi totalità nel siero durante i processi di trasformazione (9).

LIPIDI

Il grasso del latte si presenta sotto forma di globuli. Nel latte di capra il diametro medio di questi è inferiore a quelli del latte vaccino e questo determina una maggiore digeribilità per la diminuzione del tempo di permanenza nell'apparato digerente (10).

I lipidi costituiscono la parte più variabile fra i costituenti del latte. La componente lipidica del latte di capra è costituita per il 98-99% da trigliceridi e per la restante parte da acidi grassi non esterificati. Il diverso apporto dei vari acidi grassi può modificare le qualità tecnologiche e dietetiche del latte. Come mostrato in Figura 5 il latte caprino rispetto a quello vaccino, è caratterizzato da una elevata percentuale di acidi grassi a corta catena (20% vs 14%) e da una minore percentuale di acidi grassi saturi a catena lunga (11). (Figura 6).

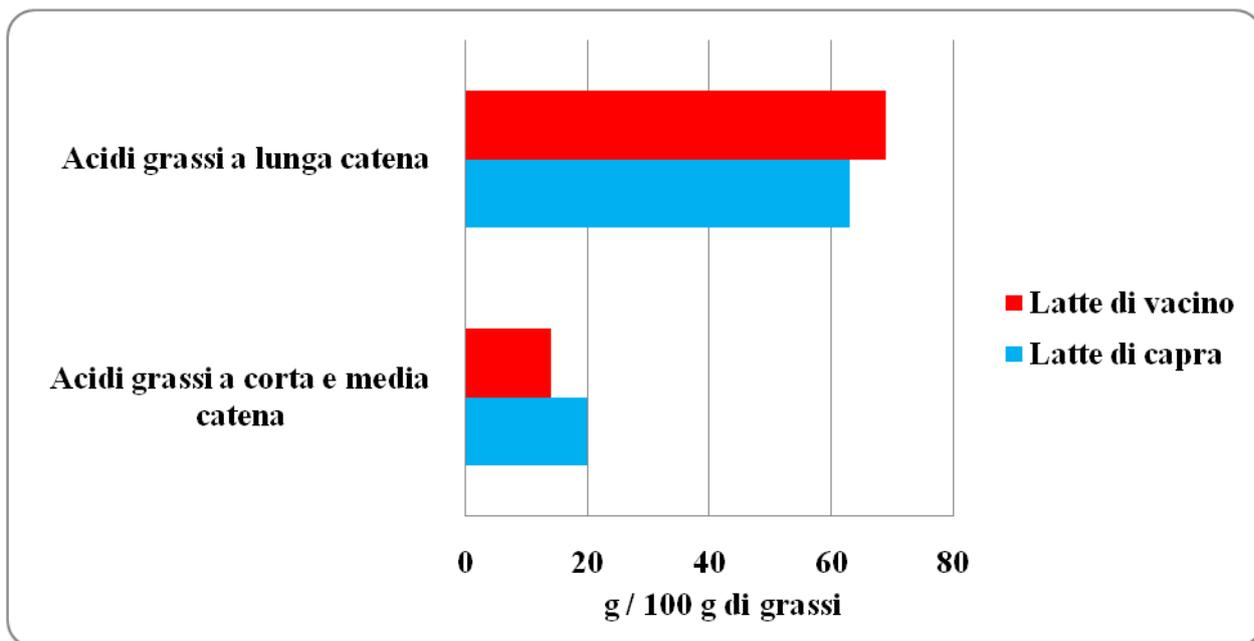


Figura 5: Confronto degli acidi grassi tra latte caprino e vaccino [11].

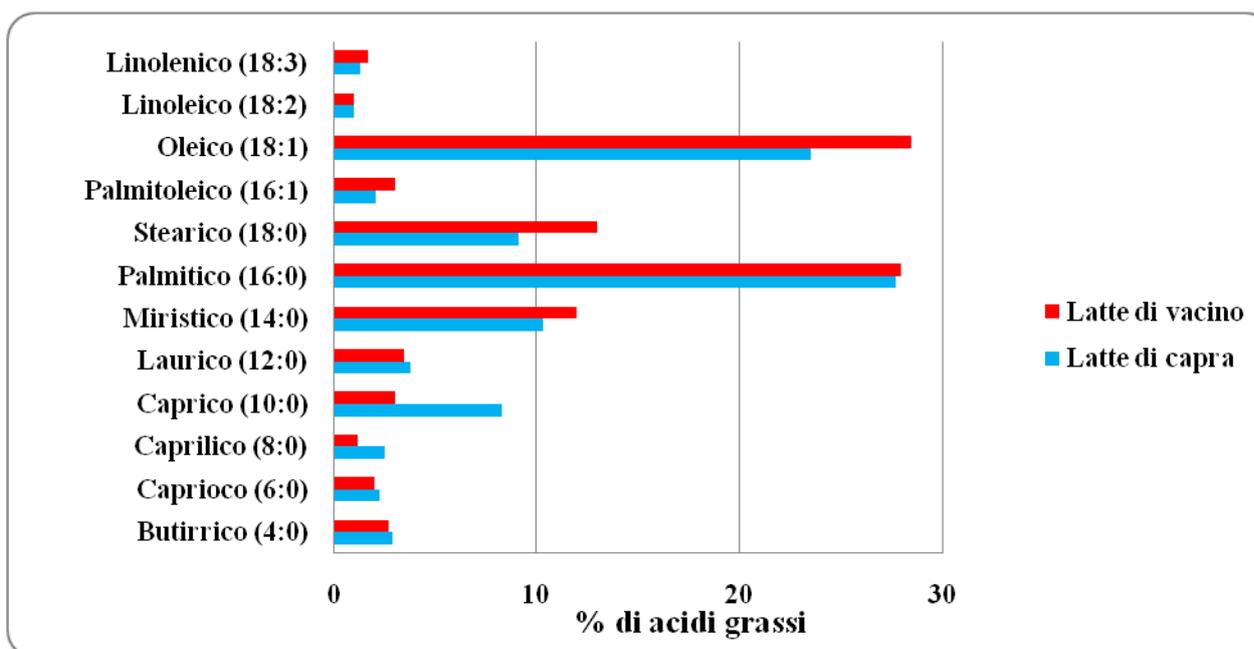


Figura 6: Composizione acidica del grasso del latte [11].

Tra gli acidi grassi, a C:18 (acido stearico) hanno origine dalla componente lipidica degli alimenti ingeriti e sono prelevati direttamente dalla ghiandola mammaria, dalle lipoproteine plasmatiche e dai trigliceridi (12 e 13).

Gli acidi grassi a C:8 e C:14 (acido caprico e acido miristico) hanno origine da glucidi derivati dalla cellulosa dei foraggi e sono sintetizzati dalla mammella a partire dall'acido acetico e dal β -idrossibutirrico, C:16 (acido palmitico) provenire da entrambi i sistemi (14).

Gli acidi grassi a media e corta catena hanno un maggior coefficiente di assorbimento intestinale di quelli a catena lunga e sono pertanto meglio digeribili. Arrivano direttamente al fegato attraverso la vena porta e non devono essere trasportati sotto forma di lipoproteine.

SALI MINERALI

Il contenuto in minerali del latte di capra è relativamente costante nel corso dell'intero periodo di lattazione. La composizione è simile a quella del latte vaccino per quanto riguarda il calcio e il fosforo, maggiori sono le quantità di cloro, magnesio e zinco, mentre minori risultano le quantità di cobalto e molibdeno. La Figura 7 mostra la percentuale di copertura della dose giornaliera raccomandata di minerali negli individui di età compresa tra i 25 e 50 anni fornita da una porzione di latte di capra (2dl) e di formaggio di capra a pasta semidura (50 g) (15).

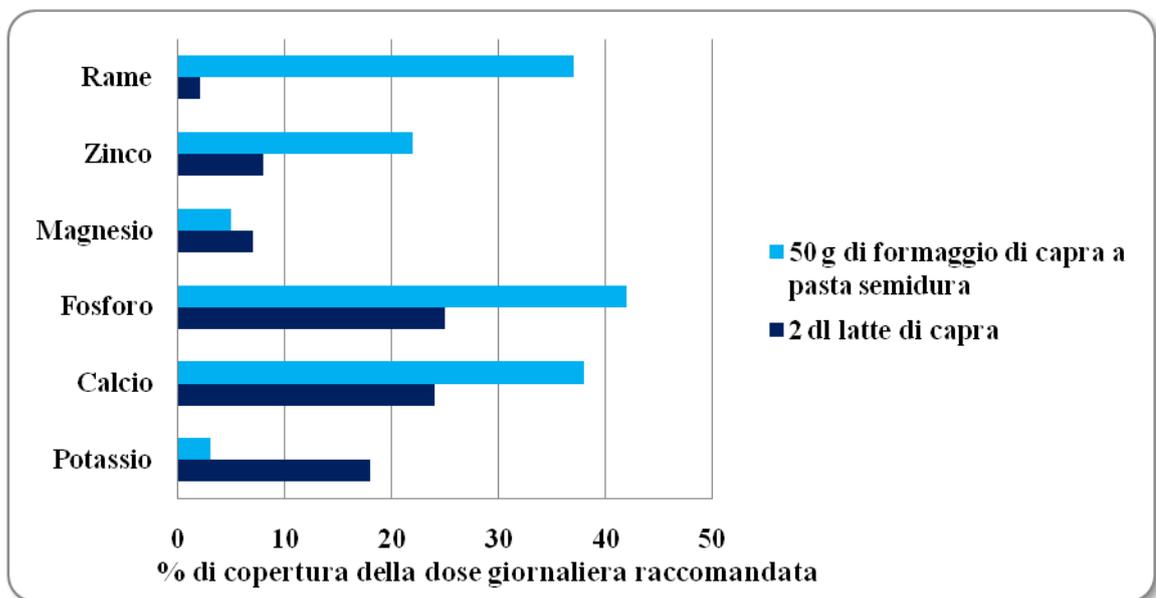


Figura 7: Percentuale di copertura della dose raccomandata di alcuni minerali (DFE, 2007)

Ad esempio, una porzione di formaggio di capra a pasta semidura copre più di un terzo del fabbisogno giornaliero di calcio e fosforo. L'elevato tenore di rame nel formaggio di capra è dovuto all'impiego di caldaie di rame nel processo di caseificazione. Il formaggio di capra tradizionale ha spesso un tenore di rame più alto poiché la quantità di latte trasformato è inferiore a quella impiegata per la fabbricazione di formaggio a base di latte vaccino e quindi il passaggio di rame nel latte è più significativo (maggior superficie di rame per litro di latte) (16).

VITAMINE

Il latte caprino è ricco di vitamina E, nicotinamide e vitamina B₁₂ mentre è povero in vitamina B₆, vitamina A e acido folico (16).

1.5 FATTORI DI VARIAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DEL LATTE CAPRINO

La produzione del latte nella capra è estremamente variabile sia quantitativamente che qualitativamente: prendendo in esame il primo aspetto si nota una grande distribuzione di valori, con oscillazioni che nella giornata vanno da 400 grammi a 5 chili di latte.

I fattori che determinano le variazioni quanti - qualitative della produzione lattea possono essere legati all'animale (fattori endogeni), oppure dovuti all'ambiente (fattori esogeni), ma possono allo stesso tempo, agire congiuntamente (4).

I fattori legati all'animale sono principalmente di natura genetica e possono essere riassunti in due gruppi: razza e individualità.

Per quanto riguarda i fattori che prescindono dall'animale, questi possono essere: zootecnici (ordine di lattazione, stadio di lattazione, stagione di inizio lattazione, modalità di mungitura, tipo e modalità di alimentazione e tecniche di allevamento) o mesologici (influenza del clima e del fotoperiodo, del suolo, dell'ambiente igienico – sanitario) (16).

Le Tabelle 8 e 9 riportano i risultati di uno studio a suffragio delle tesi sopra citate (4) che mette in risalto la variazione delle composizione di micronutrienti nel latte e formaggio di capra a seguito di differenti modalità di allevamento del bestiame: al pascolo ed in stalla entrambi da agricoltura biologica, confrontati con campioni simili per preparazione e/o stagionatura, ma di provenienza commerciale (Tabelle 8 e 9). Dalle tabelle, per esempio, si evince come siano statisticamente differenti, in funzione della tecnica di allevamento, i livelli di selenio sia nel latte che nel formaggio.

Tabella 8: livelli di micronutrienti in latte e formaggio caprino. Differenze statisticamente significative tra lettere uguali, ANOVA $p < 0.05$

| COMPONENTE | LATTE | | FORMAGGIO | |
|-----------------------|---------------|--------------|----------------|----------------|
| | PASCOLO | STALLA | PASCOLO | STALLA |
| Zinco (mg/100g) | 0.3±0.0 | 0.3±0.0 | 3.7±0.2 | 3.8±0.1 |
| Selenio (µg/100g) | 0.9±0.1 (a) | 1.6±0.1 (a) | 6.8±0.3 (e) | 10.9±0.4 (e) |
| Retinolo (µg/100g) | 69.6±16.2 (b) | 55.7±6.1 (b) | 326.7±41.7 (f) | 256.7±27.2 (f) |
| Tocoferolo (µg/100g) | 161.7±68.2(c) | 72.6±9.2 (c) | 842.0±36.5 (d) | 646.8±72.7 (d) |
| Colesterolo (mg/100g) | 13.3±2.1 | 12.5±1.1 | 84.5±4.9 | 96.7±6.1 |

| COPERTURE DEI FABBISOGNI (%) | | ZINCO | | SELENIO | VITAMINA A | | VIT. E |
|------------------------------|----------------|---------|----------|-----------|------------|----------|-----------|
| PRODOTTO | | UOMO | DONNA | ADULTO | UOMO | DONNA | ADULTO |
| LATTE | <i>PASCOLO</i> | 8.1±0.9 | 11.6±1.2 | 4.1±0.7 a | 25.4±6c | 29.3±7 e | 5±2.2 f |
| | <i>STALLA</i> | 7.8±1.1 | 11.1±1.5 | 7.2±0.5 a | 20.4±2c | 23.8±2 e | 2.3±0.3 f |
| | <i>COMMER.</i> | 8 | 11 | 6 | 19 | 22 | 4 |
| FORMAGGIO | <i>PASCOLO</i> | 18.7±1 | 26.7±1.7 | 6.3±0.3 b | 27±3.3d | 31.3±3 | 5.3±0.2 g |
| | <i>STALLA</i> | 18.3±1 | 26.9±0.9 | 9.9±0.4 b | 21±2.0d | 24.6±0.3 | 4.0±0.5 g |
| | <i>COMMER.</i> | 8 | 11 | 5 | 23 | 27 | 4 |

Tabella 9: Copertura percentuale dei fabbisogni di zinco, selenio, vit. A ed E garantita da due porzioni giornaliere (250 g) di latte caprino e da una porzione (50 g) di formaggio caprino. I dati sono riportati come valore medio dall'analisi di 45 campioni di latte e 18 di formaggio ± deviazione standard. Il dato commerciale è il valore medio di tre determinazioni. Differenze statisticamente significative tra lettere uguali. ANOVA, $p < 0.05$.

1.6 QUALITA' DEL LATTE ED ATTITUDINE TECNOLOGICA

L'accertamento e la conoscenza della qualità del latte sono due momenti fondamentali e preliminari a qualsiasi altro trattamento del prodotto, in quanto permettono di esprimere una valutazione sul latte stesso e sulla sua attitudine alla trasformazione tecnologica: quest'ultima è tanto più importante se correlata alla destinazione principale del latte di capra che, in Italia come in altri Paesi, è la caseificazione (16,17).

Questo giudizio è d'altronde necessario come punto di partenza per interventi mirati ad un miglioramento delle caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche.

La valutazione qualitativa di un latte si ottiene dall'esame delle caratteristiche chimico-fisiche, della carica batterica e dal tracciato tromboelastografo: quest'ultimo consente di esaminare l'attitudine alla coagulazione e quindi la sua caseabilità, integrando le informazioni a riguardo con quelle chimiche. Le analisi microbiologiche comprendono in primo luogo la determinazione della Carica Batterica Totale e dei coliformi totali e dell'*E. coli*; questi due ultimi indici che forniscono informazione dell'accuratezza igienica delle operazioni, possono a valori troppo

elevati pregiudicare la lavorazione casearia, aumentando il rischio di andare incontro a gonfiori, soprattutto precoci, e ostacolando il normale sviluppo della microflora casearia.

Altre analisi utili consistono nel rilevamento della presenza di microorganismi patogeni, quali ad esempio salmonelle e stafilococchi di origine pastifica (*S. aureus*) oppure *Brucella melitensis*, agente eziologico della brucellosi. Questa infezione nell'uomo deriva nella maggior parte dei casi proprio dal consumo di prodotti di origine caprina o ovina, quali il latte o derivati non trattati termicamente; nel formaggio questo batterio può resistere fino a 60 giorni, limite insufficiente in molti casi a garantire una "auto - sterilizzazione" entro il momento del consumo, dato che i formaggi di capra sono in gran parte freschi o a breve stagionatura.

È quindi importante cercare di contenere la contaminazione microbica mediante l'uso di precauzioni igieniche sia negli ambienti di allevamento, sia nel corso della mungitura, sia sul latte appena munto, che deve subire immediatamente una filtrazione per allontanare le particelle di sporcizia più grossolane, facendo subito seguire la refrigerazione per rallentare lo sviluppo microbico.

Un utile parametro per rilevare mastiti sub-cliniche è il numero di cellule somatiche contenute nel latte; cellule che in gran parte provengono dalla desquamazione degli alveoli della mammella e in parte dai leucociti del sangue: questo valore è mediamente minore all'inizio della lattazione ($3-6 \cdot 10^5$ cell/ml) e più elevato al termine ($6-8 \cdot 10^5$ cell/ml), comunque superiore rispetto al latte bovino (17). Per essere significativa la conta deve riferirsi ai latti individuali e non di massa, un innalzamento brusco e spesso collegato ad un aumento dei leucociti affluiti alla ghiandola mammaria come risposta da un attacco esterno è indice di una possibile infezione in atto.

Un esame chimico-fisico completo consente per prima cosa di esprimere un giudizio sul valore nutritivo del latte e dal punto di vista della caseificazione la determinazione di parametri più influenti come il tasso lipidico, le frazioni azotate e il contenuto di calcio e fosforo. Il grasso viene trattenuto in buona parte dalle maglie della caseina precipitata e, di conseguenza, ad un buon contenuto nel latte corrisponderà una buona presenza di grasso nel formaggio. È da tener presente oltre al valore nutritivo del grasso anche la sua influenza nella determinazione del profilo aromatico del prodotto finito (5). È invece il tenore proteico ad influenzare maggiormente sulle rese delle trasformazioni casearie. Tra le proteine spicca il ruolo delle caseine e delle sieroproteine. Le prime utilizzate per la produzione del formaggio dopo caseificazione, le seconde utilizzate per la produzione di ricotta (4).

1.7 FORMAGGI CAPRINI

Il formaggio per la legislazione italiana (RDL n.2033 del 15.10.1925) è il prodotto che si ottiene dalla coagulazione acida e/o presamica del latte intero o parzialmente scremato o totalmente scremato o dalla crema, anche facendo uso di fermenti e sale da cucina, ove per latte senza specificarne la provenienza si intende quello vaccino.

In Italia, secondo dati Assolatte del 2002, la produzione totale di formaggi caprini si attesta sulle 6.500 tonnellate/anno. A questa rilevazione, naturalmente, sfugge la gran parte delle produzioni locali e artigianali, per cui si stima che complessivamente la produzione reale sfiori le 10-20.000 tonnellate/anno di formaggi di capra puro e le 3-5.000 tonnellate di formaggi caprini misti.

In realtà esistono in Italia, come altrove, molti tipi di formaggi distinti secondo numerosi criteri di classificazione. Principalmente si evidenzia la materia prima impiegata (latte di vacca, di pecora, di capra, di bufala o miscele), il contenuto in grasso (magro, leggero, semigrasso, grasso), la consistenza (molliti, semiduri, duri), il tipo di coagulazione (lattica, presamica, mista), la temperatura di cottura della cagliata (a pasta cruda, semicotta, cotta) e durata della stagionatura (freschi, semistagionati, stagionati).

Il latte caprino sul territorio italiano è utilizzato per ottenere numerose specialità, ognuna con la sua storia e caratteristica di processo. Il latte di capra si presta sostanzialmente a due tecnologie produttive, distinguibili in “coagulazione lattica”, lenta, dovuta in prevalenza all'azione acidificante dei batteri lattici, e in “coagulazione presamica”, rapida, ove prevale l'azione degli enzimi coagulanti del caglio (16).

1.7.1 FORMAGGI CAPRINI A COAGULAZIONE LATTICA

In questa categoria rientrano le più rinomate produzioni caprine: i caprini freschi. Spalmabili, cremosi, a pasta bianca e senza crosta, sono caratterizzati da un sapore dolce e leggermente acidulo, molto apprezzati oggi per il loro gusto delicato, saporito e per la freschezza in bocca.

Generalmente si presentano, sia a livello artigianale che industriale, con pezzatura compresa tra i 30 e 200g, spesso di forma cilindrica e destinati al consumo entro 1 settimana. In qualche caso, meno frequentemente, i caprini freschi sono sottoposti ad una breve stagionatura (20-30 giorni) dopo essere stati insemenzati, per aspersione, con una soluzione salina contenente spore di muffe tipiche (*Penicillium spp.*) in grado di formare un feltro superficiale colorato e caratterizzare sensorialmente il prodotto.

La resa di questi formaggi è buona (14-18% per i freschi e poco meno per quelli stagionati) grazie alla loro elevata umidità (4).

La tabella 10 riporta le percentuali dei principali costituenti, mentre la figura 8 evidenzia lo schema di produzione.

| | Caprino fresco | Caprino breve stagionatura |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Acqua | 51-65% | 41-50% |
| Grasso | 15-18% | 19-28% |
| Proteine | 16-19% | 22-25% |
| Ceneri | 35% | 57% |

Tabella 10: Composizione media del caprino prodotto con coagulazione lattica

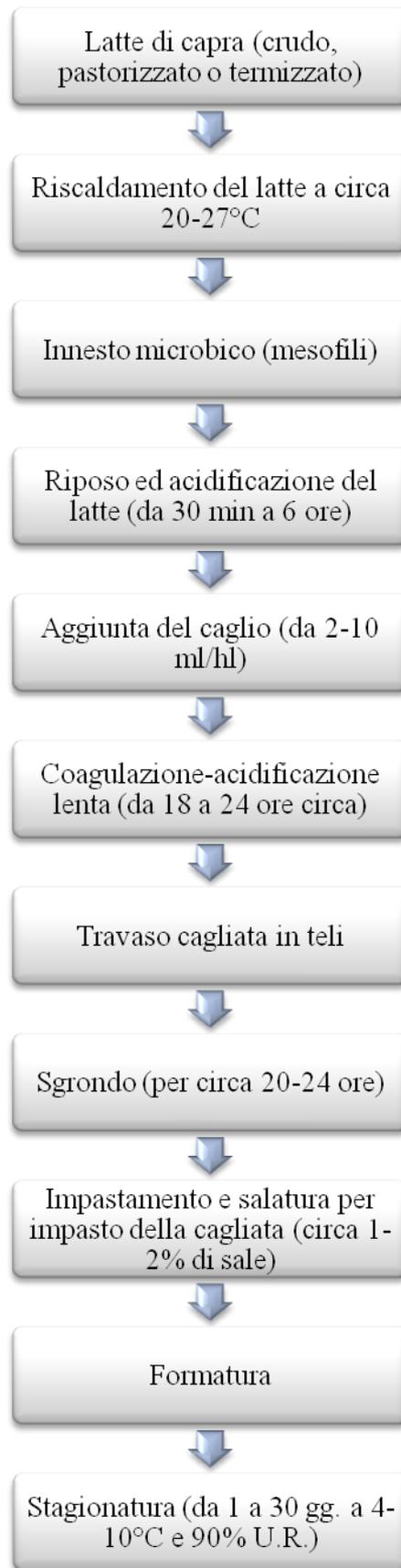


Figura 8: Schema di produzione generale del formaggio caprino a coagulazione lattica

Il latte crudo può essere trattato o meno a diverse temperature a seconda della qualità microbiologica e la dimensione dell'ambito produttivo.

Mentre i formaggi artigianali, prodotti in aziende agricole di piccole dimensioni, affidavano e affidano tuttora l'acidificazione del latte alla fermentazione spontanea operata dalla popolazione microbica autoctona del latte crudo, nei moderni processi industriali ciò è ottenuto da latte trattato termicamente successivamente inoculato con colture specifiche di batteri lattici. Nel caso il latte presenti bassa carica microbica, si attuano trattamenti di termizzazione bassa a 62-65°C per pochi secondi, soprattutto per quelle cagliate destinate a spurgare negli stampi; mentre si preferisce ricorrere alla termizzazione alta (66-68°C per alcuni secondi) o pastorizzazione per i coaguli spurganti in tele. In alcuni casi, un'aliquota di latte è trattato ad una temperatura superiore agli 80°C così da recuperare per denaturazione le proteine solubili ed aumentare la resa complessiva.

L'operazione successiva è l'innesto microbico, attuato per iniziare l'acidificazione del latte. Esso può consistere in starter selezionati prodotti da industrie specializzate oppure sieroinnesto naturale ottenuto a partire dal siero spurgato nella lavorazione precedente. L'inoculo, solitamente corrispondente all'1-2% del volume totale, principalmente è rappresentato da cocchi lattici mesofili omofermentanti quali *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. diacetylactis*. L'acidificazione richiede da 30' a 6 ore ed è seguita dall'aggiunta di caglio in piccole dosi, difficilmente oltre i 10ml/hl. Dopo un tempo di presa variabile tra i 10 e i 20 minuti, si ha la coagulazione lenta che si protrae anche per 24 ore ad una temperatura pari a 22-25°C (16).

Al termine della coagulazione il pH ottimale sarà vicino al punto isoelettrico della caseina (pH=4,6): questo valore di acidità determina il passaggio del calcio dallo stato colloidale alla forma solubile con conseguente demineralizzazione della caseina. Il coagulo che si forma è tipicamente friabile e in grado di trattenere poco siero. Valori di pH differenti possono compromettere la produzione: se superiori a 4,8 la pasta tende ad essere morbida ed appiccicosa, lo spurgo avviene male e il formaggio mal si conserverà. Se invece il pH è troppo basso (<4,3) il sapore diviene troppo acido ed il coagulo asciutto e fragile.

La fase successiva consiste nel delicato trasferimento della cagliata in un telo per lo spurgo o, nel caso delle produzioni artigianali, spesso già direttamente negli stampi. Durante lo spurgo, che lentamente avanza per 20-24 ore a temperatura ambiente, si eseguono tre o quattro rivoltamenti. Si prosegue con l'aggiunta del sale in ragione del 1-2%: nel caso sia già nello stampo la salatura avviene a secco sulle facce del formaggio, mentre se si trova nel fagotto la cagliata viene estratta, impastata col sale rendendo il tutto più omogeneo possibile. Infine si procede alla formatura, di solito manuale, ed all'asciugatura finale. Lo scopo principale dell'asciugatura, realizzata su griglie o stuoie a 15°C per 1-4 giorni, è quello di diminuire

l'umidità superficiale per favorire la crescita di microrganismi interessanti a scapito di muffe indesiderate. I caprini freschi sono così pronti per il consumo. Per mantenere più a lungo il prodotto è possibile aggiungere al momento della salatura del sorbato di potassio (1%) oppure recentemente si utilizza come soluzione il confezionamento in atmosfera controllata.

La produzione dei caprini freschi stagionati, invece, richiede qualche passaggio ulteriore. Come già accennato, i formaggi vengono insemenzati nella fase di salatura oppure spruzzati superficialmente con spore di *Penicillium* (ad esempio *P. camamberti* o *P. caseicum*) per dare al prodotto finito una tipica crosta fiorita di colore bianco.

Esistono anche, soprattutto in Lombardia, alcune produzioni più complesse e articolate che presentano un gusto intenso, piccante e una crosta rosa-rossa, dovuta alla presenza in superficie di specie della famiglia delle Micrococcaceae e *Brevibacterium* spp. .

Per favorire la comparsa di muffe e la stagionatura i formaggi vengono posti in celle ben areate, su griglie metalliche, a 10-14°C e con una umidità relativa superiore all'85% per un periodo compreso tra i 10-30 giorni.

1.7.2 FORMAGGI CAPRINI A COAGULAZIONE PRESAMICA

Sono caprini ottenuti con coagulazione spiccatamente presamica, quindi con dosi superiori di caglio che, solo in Italia, presentano un numero grandissimo di varietà. Di solito si tratta di formaggelle di medio - piccole dimensioni, a forma cilindrica con facce piatte e scalzo più o meno bombato, difficilmente con un peso superiore al chilogrammo. Essi sono più asciutti dei caprini freschi, hanno un gusto maggiormente pronunciato e crosta evidente, soprattutto se stagionati a lungo. Le rese, come è facile immaginarsi, sono nettamente inferiori dei caprini freschi.

La Tabella 11 ne riporta la composizione centesimale.

| | Caprino presamico stagionato |
|-----------------|-------------------------------------|
| Acqua | 35-45% |
| Grasso | 24-32% |
| Proteine | 20-26% |
| Ceneri | 3-4% |

Tabella 11: Composizione media del caprino presamico stagionato.

All'interno di questa categoria, possiamo distinguere due preparazioni: a pasta cruda e a pasta semicotta. Ogni produttore, soprattutto a livello artigianale, segue differenti criteri produttivi: in

particolare non sempre viene effettuato un innesto microbico, ma si lascia che sia la flora autoctona del latte e la popolazione microbica presente nell'ambiente ad influenzare e caratterizzare il prodotto. Le due tipologie presentano molte affinità produttive, rappresentate nella figura 9.

Nel caso dei formaggi a pasta cruda il latte, crudo o trattato termicamente, viene portato a 30-32°C circa. In questo frangente, se il casaro lo ritiene opportuno, vengono aggiunti in ragione dell'1-2% i fermenti mesofili omo ed etero fermentanti (principalmente *L. lactis*, *L. cremoris* e *L. lactis subsp. diacetylactis*) eventualmente miscelati con termofili come *S. thermophilus*. In seguito ad inoculo, il latte viene lasciato maturare per circa mezz'ora sino ad acidità finale pari a circa 8-9°SH/100, quindi si procede all'aggiunta del caglio (1:10000), solitamente 25ml/100hl.

Il tempo di presa è circa 20' e dopo circa 45' si attua il primo taglio, si lascia riposare qualche minuto e si procede con il secondo taglio sino a dimensioni di una nocciola. Dopo una blanda agitazione della cagliata si lascia riposare per 5' circa.

Dalla cagliata viene poi estratto metà del siero e la restante miscela siero-cagliata è travasata negli stampi. A questo punto gli stampi sono sottoposti a stufatura a 22-24°C per circa 15-20 ore e rivoltati varie volte per facilitare lo spurgo. Al termine della stufatura, si estrae la cagliata dallo stampo e si procede alla salatura: a secco cospargendo il sale sulle facce e sullo scalzo fino a che il formaggio ha cessato lo spurgo, oppure per immersione in salamoia a 18°Bè, 12-15°C per circa 1-2 ore. Infine le forme vengono poste, tipicamente su assi di legno, in locali dedicati alla stagionatura che presentano una temperatura pari a 8-12°C e umidità relativa di circa 85%. I formaggi vi alloggiano per un periodo variabile tra i 15-45 giorni e sono spesso rivoltati e puliti.

Per quanto riguarda i caprini presamici a pasta semicotta la procedura è molto simile, salvo che la seconda rottura della cagliata è seguita dalla cottura a 42-45°C. In seguito alla stufatura il formaggio è raffreddato a 4°C per fargli acquistare consistenza e sottoposto a salatura, quasi sempre in salamoia. La stagionatura si protrae anche fino a 4 mesi. Alcuni esempi di questi formaggi sono lo Stael e il Caprino Pugliese.



Figura 9: Processo di produzione del formaggio a coagulazione presamica.

1.8 PROBLEMATICHE MICROBIOLOGICHE NELLA FILIERA DEL LATTE CAPRINO

Le ripetute crisi nel settore della sicurezza alimentare hanno ridotto il livello di fiducia da parte del consumatore. L'opinione pubblica non dispone di una sufficiente conoscenza della produzione zootecnica e del settore agro-alimentare ed è spesso disorientata dall'informazione ricevuta tramite i mass-media, che non sempre forniscono gli elementi per comprendere l'estensione e la rilevanza dei problemi inerenti la sicurezza (16). Il clima d'incertezza in diverse circostanze ha influenzato negativamente il mercato, con ripercussioni sui volumi di vendita e sui prezzi non sempre proporzionate al rischio e alla portata dei problemi.

Le difficoltà incontrate dalle Autorità governative nella gestione del rischio e delle emergenze alimentari nonché le carenze emerse nelle garanzie sull'igiene e sulla sicurezza nelle filiere di produzione, hanno reso necessaria la revisione della legislazione alimentare dell'Unione Europea. Attualmente la legislazione alimentare comunitaria con il recente "Pacchetto Igiene" definisce principi, obblighi e requisiti da rispettare per assicurare un elevato livello di protezione del consumatore e la catena alimentare è considerata come un unico processo, a partire dalla produzione primaria inclusa (Regolamento CE 178/2002).

L'assetto legislativo alimentare della UE, in considerazione della portata della revisione in atto, non ha assunto ancora carattere definitivo. A livello nazionale le innovazioni introdotte determinano un periodo transitorio in cui sarà necessario procedere alla revisione ed all'adeguamento dell'impianto legislativo. Il Ministero della Salute è chiamato nel mentre ad accelerare la definizione delle misure d'attuazione, per assicurare i necessari indirizzi agli operatori del settore nell'affrontare le maggiori responsabilità loro attribuite.

1.8.1 I MICRORGANISMI PATOGENI E LA FILIERA DEL LATTE

a) i dati della sorveglianza epidemiologica

Il comparto del latte e dei prodotti a base di latte, particolarmente attento alle tematiche della qualità e della gestione igienico-sanitaria, è stato investito in misura più contenuta dalle crisi inerenti la sicurezza alimentare. Le tecnologie e le misure adottate hanno progressivamente ridotto il rischio di contaminazione da parte dei microrganismi patogeni ed hanno consentito di ottenere significativi successi nel ridurre l'incidenza dei casi di malattia associati al consumo di latte e prodotti derivati (16).

I microrganismi e le loro tossine ancora oggi hanno notevole incidenza quali agenti di malattie di origine alimentare. I risultati dei programmi di sorveglianza condotti nelle aree

economicamente sviluppate evidenziano che il numero dei casi di tossinfezione è elevato (16) e notevolmente superiore risulta la frequenza dei casi stimati per anno (18).

Al consumo di latte e prodotti a base di latte è attribuito lo 0,5-5% dei casi di tossinfezione alimentare (19,20) mentre hanno maggiore importanza epidemiologica altri alimentari, quali le carni, le uova ed i prodotti di pasticceria (EFSA, 2005). Per le diverse specie dei microrganismi patogeni il livello di rischio risulta differente in relazione al prodotto considerato ed alle abitudini alimentari. Ad esempio al consumo di latte crudo è attribuito un elevato numero dei casi di tossinfezione da *Campylobacter*, *Salmonella* ed *E. coli* O157, in seguito alla contaminazione fecale nella fase della mungitura (19).

Al consumo di formaggi molli, in particolare a crosta lavata o erborinati, è associato un livello più elevato di rischio di Listeriosi (20).

I dati della sorveglianza epidemiologica sui casi di malattia di origine alimentare nell'uomo sono consistenti con i risultati dei piani di controllo e di sorveglianza sull'incidenza dei patogeni negli alimenti. Delle segnalazioni pervenute al sistema di allerta UE nel corso del 2004 (EC, 2005), comprensive dei rischi chimici, fisici e biologici, un terzo aveva per oggetto i prodotti di origine animale ed il 5,5% delle informazioni e notifiche riguardanti questa categoria riguardava i prodotti lattiero - caseari.

Nel corso degli ultimi due anni l'UE ha condotto un'estesa valutazione della sicurezza microbiologica dei formaggi (Raccomandazione CE 2004/24; Raccomandazione CE 2005/175). Sono state svolte indagini per la ricerca di *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* ed *E. coli* in formaggi ottenuti da latte pastorizzato e, insieme a *Campylobacter* termofilo, nei formaggi prodotti con latte crudo o termizzato. L'indagine è stata condotta in Italia (2004) su 1943 campioni appartenenti a differenti tipologie di formaggi al latte crudo e termizzato, prelevati alla produzione ed alla vendita. Tra i patogeni maggiori è stata rilevata la presenza di *Salmonella* in un campione (0,05%). Rispetto ai criteri microbiologici definiti, sono risultati non conformi per *S. aureus* ($m=10^3$ ufc/g, $M=10^4$ ufc/g) 39 campioni (2,0%) e per *E. coli* ($m=10^4$ ufc/g, $M=10^5$ ufc/g) 23 campioni (1,2%). In nessun campione è stata rilevata la presenza di *L. monocytogenes* e di *Campylobacter* (100). I risultati ottenuti in altri paesi UE nell'ambito del medesimo programma indicano una situazione abbastanza confrontabile per i patogeni maggiori (101). In Francia la percentuale dei campioni non conformi è risultata invece elevata per Stafilococchi coagulasi positivi (11% nei formaggi freschi e 20% nei formaggi stagionati) ed *E. coli* (7% nei formaggi freschi e 3,5% nei formaggi stagionati).

b) i pericoli microbiologici e i prodotti lattiero-caseari

I batteri patogeni che possono determinare malattia alimentare in seguito al consumo di formaggi sono numerosi. I principali sono rappresentati da *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp (*S. enteritidis*, *S. dublin* e *S. typhimurium*) ed *E. coli* patogeno (22).

E' difficile definire in modo organico la reale incidenza delle tossinfezioni dovute ai formaggi di pecora e di capra, anche perché i risultati dei programmi di sorveglianza sono riportati in genere in forma aggregata. I dati disponibili (Tabella 12), che offrono indicazioni sulle specie patogene isolate con maggiore frequenza in episodi di tossinfezione, derivano prevalentemente da segnalazioni e rassegne bibliografiche (23,24).

I problemi di sicurezza dei prodotti ottenuti dal latte dei piccoli ruminanti mostrano alcune specificità legate alle condizioni sanitarie degli allevamenti, alle condizioni igieniche della raccolta, alla strutture o alle tecnologie utilizzate per la trasformazione.

Nella produzione primaria le tecnologie di allevamento e di alimentazione degli animali, il loro stato sanitario e le modalità di raccolta e di conservazione del latte influenzano in misura determinante le specie ed il livello di contaminazione microbica. Nelle fasi successive questi fattori condizionano l'efficacia degli ostacoli introdotti nel corso della trasformazione.

L'incidenza dei casi di Brucellosi umana è infatti maggiore nelle aree dove la patologia è endemica negli allevamenti (24). Nelle aziende caprine che utilizzano gli insilati, il rischio dell'insorgenza di Listeriosi negli animali è elevato ed è più probabile la contaminazione del latte (25). Le tecniche di mungitura, non sembrano avere incidenza sulla prevalenza delle mastiti (26), mentre esercitano una selezione delle specie microbiche agenti di mastite subclinica. Nel corso di indagini condotte tra alcune razze caprine (26), è stato osservato che negli allevamenti dove viene praticata la mungitura meccanica, rispetto a quelli in cui la mungitura è manuale, l'isolamento di *S. aureus* risulta più frequente (5,2% vs 2,1% dei patogeni isolati). La prevalenza degli Stafilococchi coagulasi negativi, i principali agenti di mastite subclinica nella capra da latte (27,28), al contrario diminuisce (71,6% vs 91,5%).

L'efficienza degli "ostacoli" in grado di controllare la contaminazione microbica del prodotto e le possibili *ricontaminazioni* nelle successive fasi del processo, dallo stoccaggio del latte in azienda alla trasformazione e stagionatura dei formaggi, hanno importanza determinante per la sicurezza.

Nelle tecnologie casearie gli "ostacoli" sono diversamente applicati con risultati estremamente variabili sulle caratteristiche dell'ecologia microbica dei prodotti. Un ruolo fondamentale esercitano al riguardo i trattamenti con il calore, la rapidità ed il valore finale di acidificazione della cagliata, gli starter microbici, la cottura e la stufatura della cagliata, le modalità di

salagione, il livello e la rapidità di riduzione dell'umidità nel formaggio, la competizione microbica e le modificazioni che i microrganismi inducono sulle caratteristiche del prodotto, la durata e la temperatura della maturazione e stagionatura (28). Un'appropriata combinazione di ostacoli atti a controllare la microflora sembra poter garantire la sicurezza dei prodotti lattiero-caseari, rispetto al ricorso esclusivo ai trattamenti microbici, che hanno più volte dimostrato di non essere una garanzia assoluta per la prevenzione delle malattie alimentari (29).

| Prodotto | Anno | Casi n. | Batterio | Nazione | Bibliografia |
|-----------------|-------------|----------------|-----------------------|----------------|---------------------|
| L. crudo capra | 1985 | 2 | <i>S. aureus</i> | Scozia | Sharp, 1989 |
| F. molle capra | 1988 | 1 | <i>L. monoc.</i> | Inghilterra | Azadian, 1989 |
| F. di capra | 1990 | 277 | <i>S. paratyphi B</i> | Francia | Grimont, 1991 |
| F. di capra | 1993 | 273 | <i>S. paratyphi B</i> | Francia | Desenclos, 1996 |
| L. crudo capra | 1994 | 22 | <i>E. coli O157</i> | Scozia | Ammon, 1997 |
| F. di capra | 2002 | 11 | <i>Brucellosi</i> | Spagna | Méndez, 2003 |
| L. crudo capra | 2005 | 27 | <i>Febbre Q</i> | Estonia | Kerbo, 2005 |

Tabella 12: Episodi di malattia di origine alimentare associati al consumo di latte (L.) e di formaggi (F.) di pecora.

La problematica della ricontaminazione è emersa a livello nazionale abbastanza recentemente, in seguito al ritiro dal mercato di formaggi erborinati o a crosta lavata da cui era stata isolata *L. monocytogenes* (*L.m.*). La contaminazione del prodotto avviene nelle fasi successive alla caseificazione, nel corso della stagionatura o di operazioni ad essa connesse.

Una esperienza sull'individuazione delle fonti di contaminazione nei caseifici caprini industriali è stata condotta in Sardegna (30). In tali caseifici i formaggi prodotti sono prevalentemente a pasta dura o semidura (Pecorino Romano, Pecorino Sardo) e presentano caratteristiche di ecologia microbica sfavorevoli per *L.m.*, come confermato anche mediante challenge test (29). Altri prodotti come le ricotte, fresche o stagionate, costituiscono invece dei substrati estremamente favorevoli per lo sviluppo di questo patogeno.

L'indagine è stata condotta in 19 caseifici dove sono stati prelevati 408 campioni di: a) matrici alimentari: latte crudo, salamoia, formaggio molle, superficie dei formaggi duri, ricotta stagionata (superficie e pasta) e ricotta fresca; b) superfici a contatto con l'alimento: tavoli, utensili, scaffali, mani o guanti degli operatori; c) superfici non a contatto: pareti e pavimenti. I prelievi dalle superfici sono stati effettuati nei locali di caseificazione, lavorazione ricotta, salagione, maturazione e nelle celle refrigerate. *Listeria monocytogenes* è stata rilevata in 5 dei

19 stabilimenti e *Listeria spp* in 8. *Listeria monocytogenes* è stata isolata sporadicamente nel latte (1 campione), dalla superficie di formaggi duri (2), dalla superficie (2) e nella pasta (2) della ricotta stagionata. *Listeria spp* (*L. welshimeri*, *L. innocua* e *L. gray*) è stata isolata dalla salamoia (1), dalla superficie (2) e dalla pasta (1) della ricotta stagionata, dai tavoli (4), dai ripiani degli scaffali di maturazione (2), dalle pareti (2) e dai pavimenti (4).

1.8.2 LA LEGISLAZIONE ALIMENTARE DELL'UE ED IL CONTROLLO DEI PERICOLI MICROBIOLOGICI

I regolamenti del “pacchetto igiene” definiscono gli strumenti che gli operatori del settore alimentare devono utilizzare per assicurare un elevato livello di protezione per il consumatore. E' prevista l'applicazione di misure che possono assicurare il controllo dei pericoli microbiologici in tutte le fasi della filiera. La legislazione alimentare attribuisce, infatti, in modo più chiaro le responsabilità all'operatore del settore alimentare ed estende le misure di controllo alla produzione primaria. Definisce e ribadisce il sistema HACCP quale metodologia di riferimento per la gestione della sicurezza negli stabilimenti di trasformazione e ne prevede la sua applicazione secondo criteri di flessibilità e di proporzionalità del rischio. Infine riconsidera i criteri microbiologici da adottare.

a) le norme sull'igiene e la produzione primaria

Il legislatore introduce opportune differenziazioni negli obblighi previsti per gli operatori del settore alimentare, considerando le differenti condizioni in cui si svolgono le attività della produzione primaria rispetto a quelle della trasformazione. Le norme generali in materia d'igiene stabiliscono che nella produzione primaria (Regolamento CE 853/04, allegato I) devono essere adottate misure atte ad assicurare il controllo delle contaminazioni e dei rischi. Deve inoltre conservare delle registrazioni allo scopo di dare evidenza dell'avvenuta attuazione delle misure di controllo e di rendere disponibili le informazioni necessarie per la rintracciabilità e per supportare gli interventi di ritiro dei prodotti non conformi.

Mentre è unanime l'esigenza di assicurare un approccio strutturato dell'autocontrollo nella produzione primaria, le opinioni sulle metodologie da seguire per realizzarlo sembrano discordanti (28). Il legislatore comunitario, così come la Commissione del Codex Alimentarius (2004), hanno considerato che l'applicazione integrale dell'HACCP nella produzione primaria comporta concrete difficoltà. La Commissione Europea si riserva infatti di valutare la fattibilità della sua estensione alla produzione primaria. Ritiene comunque opportuno che gli Stati membri incoraggino gli operatori della produzione primaria ad applicare tali principi, per quanto possibile.

Alcuni modelli si fondano esclusivamente sulle procedure di corretta prassi igienica, in altri casi oltre a queste è prevista l'applicazione di buone pratiche di allevamento e dell'HACCP, anche

se con limitazioni o esclusioni (AAFC, 2003). L'applicazione dell'HACCP in azienda su base cogente piuttosto che nell'ambito di programmi volontari può rivelarsi talvolta controproducente o può incontrare forme di resistenza (26). La resistenza è motivata dai costi della consulenza esterna, dalle difficoltà e dal tempo necessario per sviluppare le procedure documentate e svolgere le attività di monitoraggio, registrazione e verifica (27). Nella filiera del latte alimentare bovino sono ormai diffuse le esperienze dove il management delle principali attività aziendali ha un approccio integrato e strutturato, spesso associato all'utilizzazione di risorse informatiche di rilevazione dei dati e per la gestione delle attività. Alcune aziende del settore primario hanno familiarità con l'assicurazione qualità ed hanno ottenuto la certificazione del sistema di gestione per la qualità o altre certificazioni in ambito volontario (certificazioni di prodotto, rintracciabilità di filiera o aziendale).

Nel settore dei piccoli ruminanti la graduale applicazione della legislazione può costituire uno stimolo positivo per una migliore gestione aziendale o per creare valore aggiunto per le produzioni ed in tale prospettiva si pone, infatti, la tracciabilità. Alcune misure di controllo fanno inoltre riferimento a procedure già previste da altre normative (ad es. le registrazioni inerenti il farmaco veterinario), inserite nell'autocontrollo (registrazione di determinazioni analitiche del latte) o supportate da programmi pubblici (piani di eradicazione). La gestione della sicurezza alimentare è così inserita in un contesto di buone pratiche di allevamento che, comprensive della sicurezza degli operatori, del benessere animale e della gestione ambientale, consentirebbero di delineare una prospettiva di management aziendale evoluto (Tabella 13). Sono state proposte e definite linee guida per l'applicazione di buone pratiche igieniche per il settore ovino e caprino, ma le esperienze di una loro concreta attuazione sono limitate ad alcune realtà particolari, quali ad esempio le aziende dove viene praticato l'allevamento secondo il metodo biologico.

Buone pratiche di allevamento e Buone pratiche igieniche per la produzione primaria

| | |
|-------------------------------|--|
| Identificazione degli animali | Gestione igienica della mungitura |
| Movimentazione degli animali | Stoccaggio, manipolazione e trasporto prodotti |
| Igiene degli animali | gestione del farmaco veterinario |
| Piano sanitario | Formazione del personale |
| Prevenzione delle zoonosi | Gestione dei rifiuti |

| | |
|------------------------------------|--|
| Gestione degli alimenti zootecnici | Detergenti, disinfettanti e prodotti chimici |
| Gestione igienica dell'acqua | Registrazione delle analisi |
| Pulizia degli impianti | Gestione della documentazione |
| Pulizia e disinfezione ricoveri | Lotta agli insetti nocivi e altri infestanti |

Tabella 13: Buone pratiche per la produzione primaria

b) le norme sull'igiene del latte alla produzione

Le norme di igiene specifiche del settore animale (Regolamento CE 853/2004) non apportano sostanziali innovazioni nella produzione primaria relativamente ai requisiti sanitari degli allevamenti, dei locali e attrezzature, mungitura, raccolta e trasporto. I criteri per il latte crudo alla produzione considerano esclusivamente parametri rilevanti per l'igiene e per la sanità della mammella, mentre i parametri di valutazione della qualità del latte saranno compresi in una normativa specifica. Per il latte di pecora e di capra il tenore in germi rappresenta l'unico criterio microbiologico di riferimento con valori di 1.500.000 ufc/ml per il latte destinato a prodotti a base di latte pastorizzato e 500.000 ufc/ml per il latte destinato alla produzione di formaggi al latte crudo e termizzato.

Gli Stati membri, con l'autorizzazione dell'Autorità competente, possono mantenere o stabilire misure nazionali per quanto riguarda il tenore di germi ed il contenuto in cellule somatiche per la fabbricazione di formaggi con periodo di maturazione di almeno 60 giorni e degli altri prodotti lattiero - caseari che, come la ricotta ed il burro derivano dal processo di fabbricazione di tali formaggi, purché ciò non pregiudichi il conseguimento degli obiettivi del regolamento. Anche la Commissione, assistita dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali può autorizzare per la fabbricazione di alcuni prodotti lattiero - caseari l'impiego di latte crudo non conforme ai requisiti previsti per il tenore di germi e di cellule somatiche. Gli Stati membri possono inoltre adottare specifiche disposizioni atte a vietare o limitare l'immissione sul mercato del latte o della crema crudi per il consumo umano diretto, cui è senz'altro associato un rischio microbiologico elevato.

c) i criteri di flessibilità e proporzionalità

I principi della flessibilità nell'applicazione delle misure di controllo igienico hanno notevole interesse per le produzioni tradizionali, frequenti nel settore dei piccoli ruminanti. Per i prodotti tradizionali (art.7 del Regolamento CE, 2074/2005) si intendono quelli storicamente riconosciuti o fabbricati secondo riferimenti tecnici codificati e metodi di produzione

tradizionali, oppure protetti come prodotti alimentari tradizionali dalla legislazione comunitaria, nazionale, regionale o locale.

Deroghe nazionali individuali o generali, sono applicabili per: a) consentire l'utilizzazione ininterrotta di metodi tradizionali in una qualsiasi delle fasi della produzione, trasformazione o distribuzione degli alimenti; b) tenere conto delle esigenze delle imprese alimentari situate in regioni soggette a particolari vincoli geografici; c) in altri casi, limitatamente a requisiti strutturali, layout o attrezzature.

Le misure nazionali devono essere notificate entro dodici mesi dalla concessione alla Commissione e agli altri Stati Membri che possono proporre rilievi in merito. Le deroghe nazionali hanno per oggetto i requisiti dei locali di stagionatura (allegato II, capitolo II, del Regolamento CE n. 852/2004) ed è inoltre specificato come le operazioni di pulizia e disinfezione dei locali e la loro frequenza possano essere adattate per tener conto della specifica flora ambientale. E' possibile derogare ai requisiti previsti per gli strumenti e le attrezzature utilizzate (allegato II, capitolo II, punto 1, lettera f), e capitolo V, punto 1, del Regolamento CE n. 852/2004), che devono essere comunque mantenuti in condizioni igieniche soddisfacenti e regolarmente puliti e disinfettati. L'applicazione dei principi d'igiene e delle di misure di controllo è comunque proporzionata al rischio e alle dimensioni delle produzioni. Nel caso di commercializzazione e vendita diretta dei formaggi al consumatore finale, in azienda o sul mercato locale, le Linee guida di attuazione dei Regolamenti (EC, 2005a,b) chiariscono che è sufficiente la registrazione dell'attività. Non è infatti necessario il riconoscimento che è invece previsto dal Regolamento CE 853/2004 per le attività di trasformazione. Per tali attività è previsto il rispetto delle norme generali d'igiene (Regolamento CE 852/2004) e dei criteri stabiliti per il latte crudo (Regolamento CE 853/2004).

d) la legislazione ed i criteri microbiologici

Le linee guida alla base della nuova legislazione comunitaria sono rappresentate da metodologie, condivise a livello internazionale, basate sui principi dell'analisi del rischio (IFT, 2004; Stringer, 2005). Le autorità governative sono chiamate a definire il livello di protezione appropriato (ALOP) per il consumatore e gli obiettivi di sicurezza alimentare (FSO), quali riferimenti rispettivamente per la collettività e per l'operatore del settore alimentare. L'obiettivo di sicurezza alimentare è rappresentato dalla massima prevalenza o dalla concentrazione del pericolo microbiologico nel prodotto al momento del consumo, compatibile con il livello di protezione previsto (CAC, 2005).

Un FSO può essere ad esempio la concentrazione di *L. monocytogenes* <100 ufc/g o la concentrazione di enterotossina stafilococcica <1 ng /100 g di formaggio nel momento in cui viene consumato (FIL-IDF, 2004). Per raggiungere tale scopo il prodotto all'uscita dello

stabilimento o i prodotti intermedi in ciascuna delle fasi dovranno risultare conformi ad obiettivi di performance (PO) quali ad esempio l'assenza di *L. monocytogenes* in 25 ml di latte dopo la pastorizzazione o l'assenza di *L. monocytogenes* in 25 g di formaggio all'uscita dello stabilimento. In particolare nel definire l'OP all'uscita dallo stabilimento l'operatore del settore alimentare dovrà considerare l'eventuale incremento del numero dei microrganismi nelle condizioni di distribuzione e d'uso previsti. Per ciascuna fase dovranno essere definiti criteri di performance (PC) tali da raggiungere l'OP prefissato (ad es. una riduzione pari a 6 log ufc/g della concentrazione di *L. monocytogenes* nel latte in seguito alla pastorizzazione).

Il Regolamento CE n. 2073/2005 sui criteri microbiologici è stato sviluppato considerando tali metodologie (EC, 2005 d). Le misure di controllo adottate nelle diverse fasi della filiera sono integrate con ulteriori norme di attuazione e con verifiche basate sui criteri microbiologici.

L'operatore del settore alimentare ha la responsabilità di definire come realizzare la sicurezza del processo e utilizza le analisi microbiologiche allo scopo di trarre indicazioni sull'accettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione (EC, 2005d).

I criteri microbiologici costituiscono parte integrante delle procedure HACCP e delle altre misure di controllo dell'igiene e sono applicati per la loro validazione e verifica. E' nel contesto di tali procedure che l'operatore definisce il piano dei campionamenti definendone la frequenza – salvo dove diversamente specificato - adattandola alla natura e dimensioni dell'impresa, fatti salvi gli obiettivi inerenti la sicurezza dei prodotti (EC, 2005c).

Il Regolamento CE n. 2073/2005 apporta alcune innovazioni tra le quali l'estensione a tutti i settori alimentari dell'analisi del trend per i risultati dei controlli microbiologici, in precedenza applicata al settore della macellazione. E' previsto inoltre per gli stabilimenti dove vengono prodotti alimenti pronti al consumo capaci di supportare lo sviluppo di *L. monocytogenes* il prelievo e l'analisi di campioni dalle aree di lavorazione e dalle attrezzature. Gli alimenti che appartengono a questa categoria, che comprende anche alcuni prodotti caseari (ricotta fresca o stagionata, formaggi freschi, molli, etc.), prima dell'utilizzazione non sono sottoposti a cottura o altro trattamento in grado di eliminare o ridurre a un livello accettabile il numero dei microrganismi presenti. L'esigenza di effettuare la verifica delle contaminazioni ambientali da *L. monocytogenes* era già emersa a livello nazionale ed era stata emanata al riguardo una circolare relativa alle misure di controllo dei prodotti a base di latte (Ministero della Salute, 2005).

Una ulteriore innovazione riguarda la responsabilità e le modalità di determinazione della shelf-life dei prodotti. Nella definizione della data di scadenza o del termine minimo di conservazione si deve tenere conto del fatto che i criteri siano rispettati per l'intera durata del periodo di

conservabilità, in particolare nel caso di alimenti pronti nei quali *Listeria monocytogenes* si può sviluppare. La determinazione della conservabilità, se necessario, deve essere supportata dallo studio delle caratteristiche microbiologiche del prodotto, basato sulla determinazione di parametri fisico-chimici (pH, Aw, etc.), delle concentrazioni dei conservanti, dell'influenza delle modalità di confezionamento. Altre risorse possono essere rappresentate dalla consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi, dal ricorso a modelli matematici predittivi di sviluppo o di sopravvivenza, challenge e storage test. L'attenzione verso la determinazione della shelf-life è giustificata dal rischio di sviluppo dei patogeni psicrotrofi (*L. monocytogenes*, *B. cereus*) in alimenti refrigerati di pronto consumo, ma tiene conto della prospettiva di definire in futuro dei criteri microbiologici applicabili al momento del consumo, riferiti cioè al FSO (EC, 2005 d) .

In generale, il criterio microbiologico definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o della quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita (Regolamento CE n. 2073/2005). I risultati delle analisi hanno l'obiettivo di dimostrare all'autorità competente che i prodotti possono risultare conformi ai criteri microbiologici di sicurezza per tutta la durata della vita commerciale prevista per il prodotto e nelle condizioni di conservazione "ragionevolmente attese".

Il "criterio di sicurezza alimentare", definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari ed è applicabile ai prodotti immessi sul mercato (Tabella 14).

Il "criterio di igiene del processo", definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione ed il valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale è necessario adottare misure correttive. Per tale scopo non si applica ai prodotti immessi sul mercato (Tabella 15).

Il superamento dei limiti definiti per i criteri di sicurezza alimentare comporta l'adozione delle misure correttive definite nelle procedure HACCP, l'individuazione delle cause di non conformità e la revisione del piano di autocontrollo.

Nel caso di superamento di criteri di sicurezza gli alimenti devono essere ritirati o richiamati. Se i prodotti non conformi ai requisiti sono stati immessi sul mercato, secondo quanto previsto dal Regolamento 178/2002 (art. 19), l'operatore del settore alimentare deve informare l'autorità competente. Se immessi sul mercato, ma non già in vendita al dettaglio, tali prodotti possono essere sottoposti ad ulteriore trasformazione mediante un trattamento di risanamento da effettuarsi comunque non presso la rivendita al dettaglio. E' inoltre ammessa una diversa utilizzazione del prodotto rispetto allo scopo iniziale, da autorizzarsi da parte dell'Autorità competente.

Quando i risultati delle analisi relative ai criteri di igiene del processo sono insoddisfacenti le misure correttive che è possibile adottare vengono indicate nel Regolamento (CE n. 2073/2005, Allegato I, capitolo 2).

Al controllo ufficiale svolto dall'autorità e dalle istituzioni competenti è attribuito il compito di verificare la conformità alla normativa in materia di “prodotti alimentari, comprese le norme sulla salute degli animali e sul benessere degli animali” (Regolamento CE 854/2004, Regolamento CE n. 882/2004).

| Microorganismo o tossine | Categoria | Piano di campionamento | Limiti | Metodo d'analisi di riferimento | Fase a cui si applica il criterio |
|-------------------------------|---|------------------------|--|---------------------------------|--|
| <i>Listeria monocytogenes</i> | a) Alimenti pronti: per lattanti o per fini medici speciali | n=10 | c=0 Non rilevabili in 25g | EN/ISO 11290-1 | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| | b) Alimenti pronti: che supportano ¹ la crescita, diversi da quelli indicati in a) | n=5 | c=0 100 ufc/g ² | EN/ISO 11290-2 | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| | | n=5 | c=0 Non rilevabili in 25g ² | EN/ISO 11290-1 | Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce |
| | c) Alimenti pronti: che non supportano la crescita, diversi da quelli indicati in a) | n=5 | c=0 100 ufc/g ² | EN/ISO 11290-2 | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| <i>Salmonella</i> | Formaggi, burro e panna da latte crudo o da latte sottoposto a trattamento termico < pastorizzazione | n=5 | c=0 Non rilevabile in 25g | EN/ISO 6579 | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| | Latte in polvere e siero di latte in polvere | n=5 | c=0 Non rilevabile in 25g | EN/ISO 6579 | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| Enterotossine stafilococciche | Formaggi, latte in polvere e siero di latte in polvere, come indicati nei criteri relativi agli stafilococchi coagulasi-positivi (vedi criteri di igiene) | n=5 | c=0 Non rilevabili in 25g | Metodo europeo di screening | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |

¹: non supportano la crescita di *L.monocytogenes* i prodotti con una delle seguenti caratteristiche: pH ≤ 4,4, aw ≤ 0,92, pH ≤ 5,0 e aw ≤ 0,94, conservabilità inferiore a 5 giorni. Anche altri tipi di prodotti possono appartenere a questa categoria, purché vi sia una giustificazione scientifica.

²: applicabile se il produttore è in grado di dimostrare che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità.

Tabella 14: Criteri di sicurezza alimentare applicabili ai prodotti a base di latte (Reg. CE 2073/2005).

| Microrganismo | Categoria | Piano di campionamento/ limiti | | Metodo d'analisi di riferimento | Fase a cui si applica il criterio | Azione/i in caso di risultati insoddisfacenti |
|----------------------------------|--|--------------------------------|-----|---------------------------------|---|--|
| <i>Enterobacteriaceae</i> | Latte pastorizzato e altri prodotti lattiero-caseari liquidi pastorizzati | n=5 | c=2 | ISO 21528-1 | Fine del processo di lavorazione | Controllo efficacia trattamento termico, prevenzione della ricontaminazione, verifica qualità materie prime |
| | | m=< 1 ufc/ml | | | | |
| | | M= 5 ufc/ml | | | | |
| <i>E. coli</i> ⁽¹⁾ | Formaggi a base di latte o siero di latte sottoposto a trattamento termico | n=5 | c=2 | ISO 16649-1 o 2 | Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero di <i>E. coli</i> sia il più alto ⁽²⁾ | Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime |
| | | m=100 ufc/g | | | | |
| | | M=1000 ufc/g | | | | |
| <i>Stafilococchi coagulasi +</i> | Formaggi a base di latte crudo | n=5 | c=2 | EN/ISO 6888-2 | Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero degli stafilococchi sia il più alto | Miglioramento delle condizioni igieniche di produzione e della scelta materie prime. Per valori >10 ⁵ ufc/g, sulla partita di formaggio ricerca delle enterotossine stafilococche |
| | | m=10 ⁴ ufc/g | | | | |
| | | M=10 ⁵ ufc/g | | | | |
| | Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento a t.<pastorizzazione ⁽³⁾ | n=5 | c=2 | EN/ISO 6888-1 o 6888-2 | degli stafilococchi | |
| | Formaggi stagionati a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a t. superiore ⁽³⁾ | m=10 ² ufc/g | | | sia il più alto | |
| | | M=10 ³ ufc/g | | | | |
| | Formaggi a pasta molle freschi a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a t. superiore ⁽³⁾ | n=5 | c=2 | EN/ISO 6579 | Fine del processo di lavorazione | Miglioramento delle condizioni igieniche di produzione. Per valori >10 ⁵ ufc/g, sulla partita di formaggio si ricercano le enterotossine stafilococche |
| | | m=10 ufc/g | | | | |
| | | M=10 ² ufc/g | | | | |

⁽¹⁾ *E. coli* è qui utilizzato come indicatore del livello d'igiene.

⁽²⁾ Per i formaggi che non costituiscono substrato favorevole alla crescita il conteggio di *E. coli* è abitualmente massimo all'inizio del periodo di maturazione, mentre per i formaggi che costituiscono substrato favorevole alla crescita di *E. coli*, ciò si verifica abitualmente alla fine del periodo di maturazione.

⁽³⁾ Esclusi i formaggi per i quali il fabbricante può dimostrare, con soddisfazione delle autorità competenti, che il prodotto non presenta un rischio per quanto concerne l'enterotossina stafilococca.

Tabella 15: Criteri di igiene del processo applicabili ad alcuni prodotti a base di latte (Reg. CE 2073/2005).

1.8.3 MICRORGANISMI ALTERATIVI DEI FORMAGGI

I microrganismi anticaseari o agenti di trasformazioni dannose non rispondenti alla tipicità del formaggio, si sviluppano solo in casi particolari e soprattutto in conseguenza di errate pratiche tecnologiche e possono essere causa di gravi difetti. Tra di essi possiamo considerare: i coliformi e i lieviti quando raggiungono rapidamente i valori superiori a 10^6 ufc/g (gonfiore precoce); i batteri propionici e clostridi butirrici che sviluppandosi in numero elevato ($<10^4$) in formaggi diversi dall'Emmenthal e similari possono essere una concausa di gonfiore tardivo, essi infatti utilizzano il lattosio presente trasformandolo rispettivamente in acido propionico e butirrico, anidride carbonica e idrogeno. Non è facile prevenire questo difetto: oltre ad una accurata selezione del latte di partenza, a una sua eventuale possibile pastorizzazione, all'uso di siero innesti naturali o fermenti selezionati buoni acidificanti, a un controllo accurato e costante della concentrazione delle salamoie e della temperatura delle celle di stagionatura, è possibile l'aggiunta di lisozima al latte in caldaia.

Per quanto riguarda i difetti di superficie o di crosta i più comuni sono: colorazioni anomale, dovute allo sviluppo non richiesto di batteri o muffe colorati; marciume, alterazione di tipo putrefattivo causato da sviluppo abnorme di microrganismi fortemente proteolitici e a elevata umidità dei locali di stagionatura.

1.8.4 MICRORGANISMI UTILI

Gli agenti di fermentazione utili o microrganismi caseari e rispondenti alla tipicità del formaggio sono presenti naturalmente nella materia prima o aggiunti durante il processo (*starter*). Sono rappresentati non solo da batteri lattici ma anche da altri gruppi microbici come gli enterococchi.

Esplicano tre tipi di azione: attività acidificante, avviene a carico del lattosio con produzione di acido lattico e in caso di fermentazione etero lattica anche di acido acetico e anidride carbonica; attività proteolitica, alla quale partecipano le eso ed endoproteasi di vari gruppi microbici (batteri lattici, Micrococcaceae...); attività lipolitica, consistente nella liberazione di acidi grassi e ascrivibile alle lipasi di lieviti, muffe e Micrococcaceae.

Nel complesso i microrganismi caseari aiutano il caglio nel complicato processo di maturazione che consiste nella trasformazione parziale della caseina da composto insolubile e insipido a solubile e sapido. Si svolge attraverso un complesso di reazioni biochimiche rappresentate, oltre che dalla fermentazione lattica, da altre fermentazioni collaterali (acido mista, 2,3 butilenglicolica, propionica, alcolica), da lipolisi che porta all'ottenimenti di acidi grassi liberi, chetoacidi, e metil alchil chetoni; da proteasi da cui si originano peptoni, peptidi a lunghezza diversa e alla fine amminoacidi. La tecnologia di produzione, inoltre, è in grado di selezionare e delineare lo sviluppo microbico nel formaggio: per esempio l'eventuale cottura della cagliata e

sua sosta sotto il siero è in grado di effettuare una selezione termica della microflora, determinare lo sviluppo della microflora dell'innesto e acidificazione ed avere l'inibizione parziale o totale delle attività enzimatiche secondarie associate al caglio.

1.9 LA MICROBIOLOGIA MOLECOLARE NEL CONTROLLO DELLA QUALITA' E SICUREZZA ALIMENTARE

Nel controllo della qualità e della sicurezza di un alimento la microbiologia riveste un ruolo sicuramente primario. Per questo motivo negli ultimi decenni si è affiancato alla microbiologia classica quella molecolare con particolare riferimento alla reazione a catena della polimerasi (PCR). Essa delineata nella sua forma nel 1971, diventa reale nel 1985 con la pubblicazione del primo esperimento di amplificazione del DNA. Da allora la PCR ha avuto un impatto via via crescente, inizialmente nell'ambito ristretto della biologia molecolare, approdando infine ad altre discipline scientifiche tra le quali la scienza alimentare. Questa tecnica era fino a qualche anno fa prerogativa dei laboratori di ricerca più avanzati, oggi invece si sta sempre di più affermando come tecnica di routine.

Una delle applicazioni più interessanti della PCR è la possibilità di ottenere dei “*molecular fingerprinting*”, una impronta digitale molecolare di un organismo, che permette di distinguerlo da “individui” strettamente correlati dal punto di vista genetico. Ecco quindi che anche la microbiologia ha fatto propria la tecnica del fingerprinting molecolare applicandola ai batteri. Questo può essere utile per differenti scopi:

- per identificare a livello di genere e specie e/o tipizzare un microrganismo ignoto;
- per evidenziare la presenza e l'eventuale quantità di un batterio in un determinato ambiente naturale (monitoraggio), dove “naturale” debba intendersi nella sua accezione più generale (ambienti acquatici, suolo, aria, alimenti, ecc.);
- per studiare una popolazione microbica naturale, allo scopo di verificarne il grado di polimorfismo genetico, oppure per isolare e/o identificare batteri con delle particolari capacità metaboliche, o ancora per verificare le eventuali fluttuazioni di struttura e composizione nel tempo di una matrice, in conseguenza delle variazioni delle condizioni ambientali, in modo da poter correlare la maggior o minor quantità di uno o più microrganismi ad un determinato parametro ambientale.

L'importanza delle suddette problematiche è del tutto ovvia se si pensa al ruolo che i microrganismi svolgono in una miriade di processi naturali e/o biotecnologici ed al loro contributo nelle patologie umane, animali e vegetali e come gli alimenti siano spesso i protagonisti in entrambe le considerazioni (18).

1.10 APPROCCI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLE COMUNITÀ MICROBICHE

Nell'ultimo ventennio per lo studio delle comunità microbiche, a causa dei grandi limiti correlati ai metodi "culture dependent" della microbiologia tradizionale, i microbiologi sono sempre con maggiore frequenza ricorsi all'uso delle tecniche "culture independent" della biologia molecolare che sono principalmente basate sull'analisi degli acidi nucleici. Questo ha portato ad un notevole sviluppo di tali metodiche che, al di là delle differenze che le caratterizzano, si sono sviluppate grazie all'introduzione della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a metà degli anni '80. Tale metodica infatti fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica (1993). Nello studio di comunità microbiche il DNA della totalità della popolazione viene estratto con differenti procedure (manuali o facendo ricorso a kit commerciali); successivamente esso viene utilizzato come template per l'amplificazione (PCR) di una specifica regione (*target*) del genoma utilizzando *primers* universali (ovvero non specie-specifici) che amplifichino la regione specifica del genoma di tutti gli individui che compongono quella popolazione. Poiché generalmente i prodotti di amplificazione ottenuti sono frammenti di dimensioni simili la discriminazione fra le differenti specie o ceppi deve essere ottenuta sulla base delle differenze esistenti nei domini variabili presenti sulle sequenze nucleotidiche degli ampliconi. Dunque i domini che presentano variabilità tale da permettere di discriminare su un ampio spettro a livello tassonomico devono essere fiancheggiati da regioni conservate fra le specie che consentano l'appaiamento (*annealing*) con i primers universali. A questo scopo, attualmente, in ecologia microbica la regione *target* più utilizzata è l'operone batterico ribosomale che contiene le due subunità ribosomali 16S e 23S (rispettivamente subunità maggiore e minore) separate dalla regione spaziatrice IGS (*InterGenic Spacer*). Le ragioni di questa scelta sono da ricercarsi nella sua abbondanza, nelle sue proprietà evoluzionistiche e filogenetiche che si riflettono nella presenza sia di domini altamente conservati che variabili, nel suo potenziale discriminante, nel fatto che spesso in una cellula batterica ve ne siano diverse copie il che lo rende più facilmente rilevabile ed infine la disponibilità di un gran numero di sequenze all'interno di database pubblici come ad esempio GenBank.(31). Tuttavia bisogna tenere presente che non sempre l'operone ribosomale è in grado di riflettere le differenze esistenti fra *taxa* strettamente correlati ma ecologicamente distinti. Infatti *taxa* ecologicamente distinti possono aver avuto il tempo di accumulare variazioni in sequenze neutrali in corrispondenza di *loci* che evolvono rapidamente ma non ancora in corrispondenza del 16S dell'operone ribosomale (32). Palys *et al.*(1997,2000)(33) hanno dimostrato che, ad esempio, sequenze di DNA con geni codificanti per proteine sono più efficaci del 16S rRNA nello studiare la diversità ecologica di certi batteri strettamente correlati che si trovano all'interno

della comunità. Inoltre bisogna aggiungere che l'interpretazione dei risultati si complica dal momento che per un singolo organismo possono essere ottenuti diversi ribotipi poiché le diverse copie dell'operone ribosomale appartenenti al medesimo genoma possono avere sequenze differenti (34). Per queste ragioni attualmente al fine di trovare variazioni di sequenze significative a livello tassonomico fra le varie specie si stanno studiando anche i geni *housekeeping* ovvero quei geni che sono sempre espressi ad un livello abbastanza costante durante tutto il ciclo cellulare come ad esempio la girasi B(35) (*gyrB*) o il fattore di elongazione (*Tuf*) (36) ed altri ancora. Tuttavia i database per l'uso di questi geni contengono un numero di sequenze irrisorio rispetto alla disponibilità di dati presenti nei database relativi al 16S RNA (37).

Dunque, in generale, gli approcci allo studio sul DNA totale di una comunità che si basano sulla tecnica PCR e sue declinazioni possono essere due:

- Uno nel quale si utilizzano *primers* universali che portano ad avere una miscela di ampliconi che verranno successivamente analizzati e differenziati da un punto di vista tassonomico con differenti tecniche;
- Un altro in cui si utilizzano *primers* “gruppo-specifici” o “funzionali” che detectano organismi specifici o geni di interesse.

Perché lo studio di una comunità microbica sia completo ed esaustivo dovrebbe fornire tre informazioni principali sulla popolazione: diversità all'interno della comunità, identificazione dei componenti nonché quantità reciproche dei vari individui.

1.10.1 METODICHE PRINCIPALI

Facendo riferimento allo studio dell'operone ribosomale appartenente alle comunità microbiche le metodiche che consentono di studiare il DNA batterico totale essenzialmente si suddividono in due categorie:

- Metodi che discriminano le diverse specie sulla base di differenze che riguardano la sequenza delle basi in regioni ipervariabili della subunità ribosomale 16S (DGGE, TGGE,SSCP)
- tecniche che discriminano sulla base della variazione della lunghezza di tali regioni per via delle inserzioni o delezioni che intercorrono in tali domini (LH-PCR, ARISA).

Tutte queste metodiche sono state inizialmente applicate a comunità microbiche ambientali e, solo recentemente, stanno trovando applicazione anche nel *Food*.

1.10.2 LH-PCR

La tecnica LH-PCR (Length-heterogeneity PCR) è una metodica biomolecolare che consente di discriminare le diverse specie microbiche sulla base dell'eterogeneità di lunghezza in termini di numero di paia di basi o "bp" o "base pairs") di regioni ipervariabili all'interno della regione del 16S che codifica per l'RNA ribosomiale (16S rRNA). In questa tecnica il DNA totale o "meta genomico"(38) direttamente estratto dalla comunità viene amplificato con coppie di *primers* universali fra i quali almeno il *forward* è marcato con un composto fluoro foro: 6-FAM-blu, ROX-rosso (che in genere è il colore dello standard interno), HEX-verde o NED-giallo. L'estrazione del DNA della comunità dalla matrice alimentare può essere effettuata con diversi sistemi manuali e non; tuttavia oggi esistono in commercio dei kit specifici per ogni substrato che contengono composti in grado di eliminare le sostanze (grassi, proteine, acidi umici per il suolo ecc) che potrebbero interferire con le successive operazioni di amplificazione e che, al contrario, danno prodotti pronti per essere sottoposti alla PCR (39). In seguito ad amplificazione del DNA totale gli ampliconi fluorescenti vengono caricati in un sequenziatore e durante il passaggio attraverso un capillare elettroforetico viene "detectata" la fluorescenza emessa dai frammenti che, tramite apposito software, viene tradotta in numero di paia di basi. Il risultato di quest'analisi è un elettroferogramma nel quale l'asse delle ascisse (x) rappresenta la *size* ovvero la lunghezza in numero di paia di basi dell'amplicone mentre l'asse delle ordinate (y) rappresenta la fluorescenza detectata o Unità di Fluorescenza. L'area sottesa alla curva da un'idea dell'abbondanza relativa dell'amplicone all'interno della comunità.

Il DNA dei batteri puri di collezione o isolati su terreni selettivi e differenziali ed identificati mediante sequenziamento del 16S rDNA viene amplificato con i medesimi *primers* fluorescenti utilizzati per il DNA metagenomico per essere sottoposti ad analisi LH-PCR. L'amplificazione e l'analisi LH-PCR dei ceppi puri è utile per la costruzione del *database* contenente le *size* relative a ciascuna specie batterica: sulla base di queste è possibile attribuire i picchi osservati nei profili elettroforetici della comunità mediante confronto e sovrapposizione ad una o più specie batteriche.

Le regioni ipervariabili amplificate e studiate dai vari autori sono state diverse e influenzate soprattutto dalla matrice oggetto di studio (ambientale o alimentare) e la scelta della coppia di *primers* opportuna rimane un punto critico nello studio di comunità. Questo ha portato all'utilizzo da parte degli autori di differenti *primers* a seconda delle zone bersaglio oggetto dello *screening*. Le prime applicazioni di questa metodica sono state effettuate da Suzuki nel 1998 (40). In questo lavoro Suzuki studiava la frequenza degli ampliconi ottenuti dal pikoplancton delle acque marine dell'Oregon. I *primers* in questione amplificavano i domini variabili V1-V2 e V1-V3 mentre altri *primers* erano utilizzati per amplificare l'intero 16S per la realizzazione della *clone library*. In tale ricerca Suzuki saggiò la "distorsione" introdotta dalla PCR nella tecnica LH-PCR variando il numero dei cicli di amplificazione. Passando da 35 a 25

cicli osservò che la formazione di artefatti di amplificazione dovuti al *reannealing* del template poteva essere ridotta rendendo i profili ottenuti riproducibili. Dai profili ottenuti dopo 35 cicli si poteva osservare che molti dei picchi osservati erano presenti anche nei profili acquisiti dopo 25 cicli, tuttavia, il loro contributo reciproco era cambiato proprio a causa del *reannealing*. Inoltre Suzuki comparò i profili ottenuti dai cloni con quelli delle comunità ed osservò che erano abbastanza differenti ma giustificò questo fatto con la scarsa randomizzazione adottata per l'ottenimento dei cloni. Tale studio dunque dimostrò come la tecnica LH-PCR era valida e riproducibile soprattutto riducendo il numero dei cicli di amplificazione e dunque la "distorsione" determinata dalla formazione di artefatti. Inoltre tale tecnica forniva una rapida visione d'insieme della comunità.

Altri studi si sono rivolti al suolo e all'effetto in termini di variazioni che l'apporto di nutrienti aveva sulla comunità microbica. In uno studio Ritchie *et al.* (2000) (41) avevano investigato l'effetto di differenti pratiche colturali su quattro diversi tipi di terreni mettendo a confronto la capacità di valutare i cambiamenti nella popolazione microbica con due metodi: l'LH-PCR e l'analisi FAME (Fatty Acid Methyl Ester); quest'ultima è una tecnica che utilizza i lipidi cellulari per tracciare un profilo delle comunità microbiche vitali ed era già stata ampiamente utilizzata in diversi lavori (42,43,44,45,46,47). Per quanto riguarda la tecnica LH-PCR, invece, il DNA direttamente estratto dal suolo veniva amplificato con *primers* specifici per le prime due regioni ipervariabili (V1-V2) del 16S ribosomale. Alla fine dello studio essi conclusero che la tecnica LH-PCR era più efficace nel discriminare le sottili differenze determinate dalle pratiche di coltura. Essi applicarono entrambe le tecniche anche sui cloni ottenuti dai terreni, tuttavia lavorarono soltanto su 33 cloni ed i risultati che ottennero, data la scarsa rappresentatività determinata da un numero sì piccolo di cloni, non furono significativi per inferire circa la maggiore o minore efficienza di un metodo rispetto all'altro. Altri studi effettuati da Mills *et al.* (2003 e 2007) (39,38) utilizzarono la tecnica LH-PCR per investigare terreni contaminati artificialmente ed ancora un terreno sottoposto a differenti pratiche colturali. In entrambi gli studi la tecnica LH-PCR era stata messa a confronto con la tecnica T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), tecnica dalla quale si ottengono profili di restrizione ottenuti da diversi enzimi con altrettanto diverse marcature fluorescenti. Anche in questo caso dopo analisi in sequenziatore si ottengono degli elettroferogrammi con profili di restrizione. I *primers* utilizzati per l'LH-PCR e la T-RFLP amplificavano le prime due regioni ipervariabili (V1-V2) del 16S ribosomale e l'intero 16S (con marcatura fluorescente su *forward* e *reverse*) rispettivamente. Alla fine della ricerca Mills concluse che la tecnica LH-PCR era più appropriata nel seguire le variazioni all'interno della comunità innanzitutto perché era altamente riproducibile ed in secondo luogo perché non era sottoposta a trattamenti ulteriori dopo amplificazione a differenza di quanto avveniva con la T-RFLP dove l'amplificato doveva essere sottoposto a successive restrizioni che portavano alla formazione di artefatti. Dunque

conclusione di questo lavoro fu che l'LH-PCR era la tecnica migliore per seguire le dinamiche della popolazione microbica in esame. Un'altra applicazione interessante della tecnica LH-PCR fu quella ideata da Bernhard e Field (2000) (48) i quali per identificare l'origine dell'inquinamento fecale nelle acque costiere dell'Oregon ampliarono campioni fecali umani e bovini con *primers* specie-specifici costruiti per microrganismi anaerobi fecali ospite-specifici ovvero *Bacteroides-Prevotella* spp. e *Bifidobacterium* spp. rispettivamente. Nell'analisi delle acque essi identificarono un picco a 276 bp che era bovino-specifico ma non ebbero amplificazione con il *primer* dell'ospite umano (*Bacteroides-Prevotella* spp.). Questo li portò a concludere che l'inquinamento fecale era dovuto alle pratiche di allevamento e non alla perdita di una fossa settica. Questo studio dimostrò la rapidità e la sensibilità del metodo LH-PCR e ne prospettò un nuovo utilizzo ovvero il monitoraggio ambientale. Un altro studio effettuato da Brusetti *et al.* (2006) (13) dimostrava l'utilità del metodo LH-PCR nel monitorare la successione dei batteri lattici durante la fermentazione di mais insilato. In questo studio erano stati analizzati i profili ottenuti durante la fermentazione ottimale e quelli ottenuti in condizioni di eccesso d'acqua e di ossigeno. I profili ottenuti erano differenti e nelle condizioni di fermentazione non idonee si notava un aumento nel genere *Enterococcus* sp. ed *Enterobacter* sp. a scapito dei batteri lattici utili. Fra le prime applicazioni della tecnica LH-PCR in campo alimentare si annovera un lavoro condotto da Lazzi *et al.* (2004) (12) nel quale sottoponeva ad analisi LH-PCR diversi siero innesti naturali per la produzione di Grana Padano. Le regioni investigate erano le prime due ipervariabili (V1-V2) del 16S ribosomale ed i sieri erano apparsi, eccetto che per la maggiore o minore presenza di diverse specie microbiche minoritarie, molto simili fra loro ed i picchi principali erano attribuibili alle specie *Lactobacillus helveticus*, e *Lact. delbrueckii subsp. lactis/bulgaricus*. Tali risultati erano stati confermati anche da amplificazioni specie specifiche. Un altro studio condotto da Gatti *et al.* (2008) (49) utilizzava la tecnica LH-PCR per esaminare le comunità microbiche del siero innesto del Parmigiano Reggiano e del formaggio stesso in diversi momenti della stagionatura su due componenti del DNA totale: le cellule intere, presumibilmente attive o non ancora lisate e le cellule lisate. Questo allo scopo di monitorare gli *starters* ed i LAB (Lactic Acid Bacteria) non *starters* durante il processo di produzione e maturazione del formaggio. In questo studio la tecnica LH-PCR si è rivelata molto efficace nel monitoraggio delle variazioni delle diverse specie all'interno delle comunità tuttavia ne ha confermato la scarsa sensibilità in termini di *detection* di al di sotto di cariche microbiche inferiori a 10^3 UFC/ml osservata anche nello studio precedente di Lazzi *et al.* (2004) (12).

Tutte queste applicazioni hanno dimostrato l'utilità e la rapidità della tecnica LH-PCR come metodo di *profiling* di una comunità microbica per monitorarne i cambiamenti. Tuttavia tale tecnica presenta diversi limiti prima fra tutte la suddetta scarsa sensibilità. Ancora l'analisi di prodotti di PCR marcati con fluorofori può essere corrotta dai fluorofori stessi che possono

portare a lunghezze di sequenza diverse da quelle attese a seconda che se ne utilizzi uno piuttosto che un altro (50,51). Inoltre un altro punto critico è rappresentato dalla scelta dei *primers* che non sempre è banale di fatti molto spesso *primers* che sono considerati universali non sempre amplificano le sequenze target di tutti i microrganismi con la stessa efficienza e dunque non sono perfettamente universali (52). Come conseguenza di ciò interi gruppi potrebbero essere esclusi dalla reazione di amplificazione (53,54,55,56) rendendo difficile poter identificare i membri della popolazione. In aggiunta la PCR può introdurre un'ulteriore fonte di distorsione. Infatti i profili generati da tutti i metodi basati sulla reazione di PCR sono il riflesso di un *pool* di prodotti di amplificazione e non rappresentano necessariamente la microflora del templato di partenza. Infatti la preferenziale amplificazione di sequenze abbondanti (57), la differente efficienza di amplificazione (58,59), la differenza nel numero di copie dell'operone ribosomale (60) nonché la formazione di composti "chimerici" o artefatti di amplificazione (61) sono tutti aspetti che riducono l'affidabilità della biodiversità che si osserva in una comunità dopo che essa è stata sottoposta ad amplificazione. Tuttavia Suzuki e Giovannoni (1996) (58) hanno trovato che ottimizzando il numero di cicli di PCR si possa ottenere un profilo di comunità più vicino a quello reale senza perdere informazioni sui componenti minoritari della popolazione. In generale, però, risulta rischioso inferire sulla diversità e sulla quantità delle specie microbiche di partenza. Un altro aspetto molto limitativo è quella del fenomeno delle comigrazioni (12,49): sovente accade che al di sotto di un picco ricadano più specie microbiche così che è rischioso affermare con sicurezza la presenza di una specie piuttosto che un'altra a meno che il dato non sia confermato dalla presenza fra gli isolati della specie in questione. A questo, tuttavia, si aggiungono le limitazioni nel recupero di microrganismi dei metodi *culture dependent*.

1.10.3 ARISA

La tecnica ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) è una metodica biomolecolare che consente di discriminare le diverse specie microbiche sulla base dell'eterogeneità di lunghezza in termini di numero di paia di basi (o "bp" o "*base pairs*") della regione spaziatrice dell'operone ribosomale compresa fra il 16S ed il 23S. Tale metodica è stata sviluppata da Fisher e Triplett (1999) (62): anch'essa è una metodica *culture-independent* basata sulla PCR che può essere utilizzata sia sulle comunità microbiche o DNA totale che sui ceppi puri. Anche in questo caso il templato viene amplificato con una coppia di *primers* fra i quali almeno uno è marcato con un composto fluoroforo (gli stessi visti per l'LH-PCR) che emette fluorescenza. Gli ampliconi fluorescenti vengono caricati nel capillare elettroforetico (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) che, grazie ad apposito software, traduce la fluorescenza detectata in elettroferogrammi nei quali i picchi corrispondono a frammenti discreti di DNA (bp). Il principio e l'obiettivo sono gli stessi dell'LH-PCR ovvero la costruzione di un *database*

contenente il numero di paia di basi (bp) caratteristici di una specie o di un ceppo su cui poi effettuare per confronto e sovrapposizione con i profili ottenuti dalle comunità l'attribuzione dei picchi alle specie.

La regione spaziatrice o ITS (Internal Transcribed Spacer) presenta una più significativa eterogeneità nella lunghezza e nella sequenza nucleotidica rispetto alle vicine regioni 16S e 23S. In ARISA le differenze di dimensione della regione spaziatrice sono sfruttate per classificare ceppi batterici oppure nel caso in cui i profili delle sequenze ribosomali non permettono di avere una sufficiente risoluzione(63,64). In generale la lunghezza dell'ITS può variare fra 400 e 1200 paia di basi (62).

Un'applicazione interessante di questa tecnica è stata quella effettuata da Popa *et al.* (2009)(65) i quali proposero di utilizzare il potere di risoluzione dell'ARISA per discriminare i microrganismi non più sulla base del concetto di "specie" quanto piuttosto sulla base del concetto di "filotipo" e, per estensione, di "filogruppo". Quest'ultimo rappresenterebbe dunque un gruppo o *cluster* di filotipi evidenziato da un approccio che discrimina sulla base di un approccio visivo o di *fingerprinting* o profilo caratteristico. In questo lavoro essi studiarono i filotipi del genere *Shewanella* esaminandone 44 ceppi.

L'ARISA è stata largamente utilizzata su comunità microbiche ambientali come il suolo (66 e 67) e la microflora acquatica (62, 67) dando dei risultati precisi e riproducibili. In particolare Fisher e Triplett (1999)(62) la utilizzarono per studiare le comunità batteriche di diversi tipi d'acqua dolce. Essi presero in esame i profili ottenuti da ciascuna comunità e li valutarono in base alle differenze ed alle similarità relative e trovarono che i profili erano differenti l'uno dall'altro ma che il numero dei picchi ottenuti non era molto dissimile (fra 34 e 40). Questo studio confermò la capacità di tale metodica di tracciare in modo rapido e ripetibile il profilo di una comunità microbica. In un altro lavoro Ranjard *et al.*(2001) (66) studiarono la diversità microbica e fungina di diversi tipi di terreni e confermarono ancora una volta la capacità della tecnica ARISA di caratterizzare e differenziare la composizione genetica della comunità microbica del suolo portando a profili molto differenti passando da un campione all'altro. In questo studio essi tuttavia "detectarono" un numero di picchi nettamente superiore (circa 200 per profilo) rispetto a quelli individuati da Fisher e Triplett attribuendo questo alla diversità del substrato oggetto d'esame. In un altro lavoro Schloss *et al.* (2003) (68) utilizzarono tale tecnica per seguire i cambiamenti nella popolazione microbica del compost nelle prime ore di compostaggio (0-96 h) mettendola in relazione con i cambiamenti delle variabili ambientali (temperatura, pH, concentrazione di O₂ e CO₂) all'interno della massa. Dopo aver ottenuto profili caratteristici per ciascun tempo di prelievo essi clonarono la regione 16S rDNA vicina ai principali picchi ITS visualizzati sui profili ARISA delle comunità. In questo modo poterono identificare parte dei componenti dominanti della popolazione del compost in base al sequenziamento dei cloni ed a diversi intervalli di tempo. In questo l'ARISA si rivelò utile nel

tracciare la dinamica della popolazione microbica durante le prime fasi del processo di compostaggio. In un altro studio Cherif *et al.* (2008) (69) misero a confronto l'efficacia delle due tecniche ARISA e DGGE nel valutare l'effetto che avevano differenti tipi di concimazione su terreni agricoli tunisini. Le due tecniche non evidenziarono grandi differenze nelle comunità microbiche passando da una pratica di concimazione all'altra, tuttavia, la DGGE si rivelò più precisa ai fini identificativi dei membri della popolazione microbica. La tecnica ARISA, viceversa, risultò più rapida, semplice e più appropriata per ottenere una valutazione della composizione della comunità batterica del suolo soprattutto quando dovevano essere esaminati un gran numero di campioni. Nonostante la tecnica ARISA sia stata ampiamente utilizzata su campioni ambientali in letteratura è riportato solo un caso di studio su comunità di alimenti ovvero su latte di capra e mais insilato (67). In questa ricerca Cardinale *et al.* (2004) mettevano a confronto l'efficienza di coppie di *primers* nell'amplificazione della regione spaziatrice su diversi substrati fra i quali i succitati alimenti. L'efficienza delle coppie di *primers* era valutata in termini di numero di picchi detectati nei profili ARISA, del range o ampiezza dello spettro su cui si allineano i picchi ed in termini di riproducibilità. Fra le tre coppie esaminate la migliore sotto tutti questi tre aspetti è stata la coppia ITSf e ITSr.

Anche l'ARISA, tuttavia, presenta gli stessi limiti dell'LH-PCR essendo una tecnica basata sulla PCR e che utilizza composti fluorofori. A questi si aggiunge una descritta preferenziale amplificazione di templati più corti (62) e il fatto che, poiché la lunghezza della regione spaziatrice può variare anche all'interno di un singolo genoma, un solo individuo può contribuire a generare più di un segnale (70).

1.10.4 SSCP

Questa metodica è basata anch'essa, come le due precedenti, sull'amplificazione di frazioni di DNA variabili con *primers* marcati con fluorofori. Dopo separazione degli ampliconi fluorescenti attraverso un capillare elettroforetico quello che si ottiene è ancora un elettroferogramma. Tuttavia, in questo caso, i campioni, anziché correre in condizioni denaturanti (filamento di DNA singolo e disavvolto come avveniva in l'LH-PCR o in ARISA) corre in condizioni non denaturanti. Infatti il genoma corre "rinaturato" ovvero il filamento, dopo essere stato separato, si ripiega assumendo una conformazione o, più specificamente, una struttura secondaria che dipende dalla sequenza delle basi azotate che lo compongono. In questo caso dunque i campioni non saranno più separati sulla base di un'eterogeneità di lunghezza nella regione genomica amplificata ma sulla base delle variazioni di sequenza; il risultato sull'asse delle ascisse non sarà più un numero di paia di basi (bp) ma un tempo di eluizione o *data point* mentre l'asse delle ordinate (y) rappresenta ancora la fluorescenza detectata o Unità di Fluorescenza. Anche in questo caso si procede come si era fatto per l'LH-PCR e la ARISA ovvero si costruisce un *database* contenente i *data point* caratteristici di una specie o di un

ceppo su cui poi effettuare per confronto e sovrapposizione con i profili ottenuti dalle comunità l'attribuzione dei picchi alle specie. La scelta dei *primers* rimane sempre un aspetto molto importante alla base di questa tecnica e i diversi autori ne hanno usati differenti a seconda dei substrati oggetto di studio e degli obiettivi della ricerca.

La metodica SSCP è stata applicata allo studio di comunità microbiche in matrici differenti che spaziavano dall'acqua (71) al suolo (72) e ai digestori anaerobi (73,74). Tuttavia, il suo utilizzo in campo alimentare, è si è limitato al formaggio (75,).

In particolare, per quanto riguarda l'applicazione della tecnica SSCP al campo alimentare, il primo studio effettuato sui formaggi è ascrivibile a Duthoit *et al.* (2003) (75). L'obiettivo di tale studio era stato quello di poter seguire l'evoluzione della popolazione microbica durante il processo di produzione e maturazione del formaggio Salers (prodotto riconosciuto come RDO ovvero Registered Designation of Origin). In tale sperimentazione il DNA totale di campioni prelevati presso tre differenti produttori veniva amplificato, dopo estrazione, nelle regioni V2 e V3 dell'operone ribosomale 16S. I profili dei formaggi ottenuti dai tre produttori risultarono differenti gli uni dagli altri dimostrando l'efficacia del metodo SSCP nel rilevare le differenze fra le popolazioni microbiche e le variazioni temporali delle stesse benché venisse sottolineato come l'utilizzo di una sola metodica biomolecolare non potesse dare una descrizione completa della comunità. In seguito alla costruzione di un *database* ed il clonaggio, parte dei picchi dei profili delle comunità vennero identificati.

Un altro studio interessante è stato effettuato da Saubusse *et al.* (2007) (76). Questi studiosi utilizzarono la tecnica SSCP (amplificando il DNA totale nella regione V2) per individuare profili caratteristici di formaggi nei quali non vi era sviluppo di *Listeria monocytogenes*: essi osservarono la ricorrenza di tre picchi in tutti i campioni privi di *Listeria* nei quali comigravano le specie *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus saccharominimus*, *Chryseobacterium* sp. e *Corynebacterium flavescens*, *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus lactis* rispettivamente. Lo studio proseguì poi con il saggio dell'attività anti-*Listeria* dei singoli ceppi che fu confermata solo per *Enterococcus saccharominimus*, *Corynebacterium flavescens*, *Lactococcus garvieae* e *Lactococcus lactis* e per miscele di tutti e sei i microrganismi.

In un altro studio Delbés *et al.* (2007) (77) accoppiarono l'utilizzo di tecniche *culture dependent* (sequenziamento dell'operone ribosomale 16S) e *culture independent* (analisi SSCP dell'amplificato della regione V3 del 16S) per visualizzare l'andamento della componente della popolazione microbica non dominante nel formaggio Saint Nectaire. Nei profili elettroforetici del DNA totale infatti i batteri lattici comigravano in un unico picco così che, utilizzando una miscela di microrganismi isolati dal latte crudo e dal formaggio e cresciuti su terreni che inibivano la crescita di gram positivi era stato possibile, dopo corsa in capillare delle miscele, individuarne i picchi nel profilo del latte e del formaggio e dunque l'andamento nelle diverse fasi. In questo studio venne ulteriormente confermata l'importanza di un approccio combinato

che utilizzi sia i metodi *culture dependent* che i *culture independent* in quanto forniscono informazioni complementari.

Tale tecnica è ampiamente utilizzata anche nella ricerca di mutazioni di geni specifici (78) così come nella differenziazione e nella tipizzazione di isolati (79,80).

In SSCP, così come visto in LH-PCR, assai frequente è il fenomeno delle comigrazioni di diversi ceppi batterici all'interno di un unico picco nel tracciato elettroforetico (75,76,77).

Tale tecnica, così come le precedenti, presenta tutti i limiti delle metodiche che si basano sulla PCR. Infatti l'amplificazione del DNA totale di una comunità microbica può impedire o accentuare la *detection* di alcuni genotipi (81,82,83,84). Queste distorsioni nell'amplificazione possono essere causate da un disallineamento dei *primers* presso i siti di *annealing* del template di alcuni genotipi; oppure da una più bassa velocità di ibridazione dei *primers* nei confronti di alcuni template dovuta ad una diversa denaturazione di tale DNA(85,86). In genere, tuttavia, testando differenti coppie di *primers* ed aumentando durante la PCR la denaturazione grazie all'ausilio di differenti reagenti (denaturanti e cosolventi) questi problemi possono essere ridotti (81,87,88). Un secondo tipo di falsificazioni che possono presentarsi in seguito all'amplificazione del DNA totale è la possibilità di formazione di *heteroduplex* che si producono negli ultimi cicli della PCR quando la concentrazione dei *primers* diminuisce mentre quella del prodotto di amplificazione è abbastanza alta da competere con i *primers* per l'*annealing* (84). Infine vi è la possibile creazione di ampliconi chimerici anch'essi caratteristici degli ultimi cicli di amplificazione quando la concentrazione dei *primers* non completamente estesi è abbastanza alta da competere per l'*annealing* con i *primers* originali oppure quando la concentrazione del template è abbastanza alta da permettere il *reannealing* di tale DNA prima o durante l'estensione dei *primers* (84). Tutti questi artefatti possono generare segnali addizionali che non corrispondono a genotipi presenti nel campione. Questi artefatti, tuttavia, possono essere minimizzati utilizzando un basso numero di cicli di PCR.

1.10.5 DGGE

Tale tecnica, così come visto per l'analisi SSCP, discrimina fra le varie specie batteriche sulla base delle differenze in termini di sequenza delle basi azotate in porzioni genomiche ben precise. In questo caso le differenze sono rilevate a seguito della denaturazione del doppio filamento di DNA che viene fatto correre su gel di poliacrilammide che, possedendo un gradiente di denaturazione, lo fa separare in quelli che si chiamano "Domini di denaturazione". Presumibilmente frammenti di uguale lunghezza, ma con sequenze diverse hanno domini di denaturazione differenti ed è così possibile separarli fisicamente su di un gel. Allo stesso modo microrganismi appartenenti a specie batteriche diverse possiedono differenti sequenze e, dunque, domini di denaturazione diversi. Il dominio di denaturazione è dunque specie-specifico cosicché in una miscela di DNA proveniente da diversi microrganismi è possibile detectare

specie diverse le cui sequenze differirebbero anche di una singola base azotata fra loro. La risoluzione ottimale fra diversi domini di denaturazione viene ottenuta, evitando la totale denaturazione del doppio filamento di DNA. A tale scopo vengono aggiunte ad uno dei due *primers* (generalmente il *forward*) una serie di 30-40 paia di basi azotate costituite da un'alternanza di guanina e citosina (*clamp-GC*) aventi un'elevato dominio di denaturazione: questo fa sì che possano essere studiati anche i più bassi domini di denaturazione (89,90). Alla luce di tali considerazioni il DNA delle comunità batteriche viene estratto *in toto* (DNA meta genomico) ed amplificato con i *primers* specifici per la regione genomica oggetto di studio. Successivamente gli amplificati vengono caricati sul gel di acrilammide con un gradiente di denaturazione prestabilito variabile in funzione delle caratteristiche del substrato e della tipologia di microrganismi che si trovano in esso: la scelta di questo deve essere effettuata caso per caso sperimentalmente, anche se, in genere il primo *range* denaturante adottato è 40-60%. Gli agenti di denaturazione sono forniti da formammide ed urea (una soluzione denaturante al 100% corrisponde ad una soluzione 7 M di urea ed il 40% di formamide in acqua). La miscela di frammenti di DNA a doppio filamento amplificati corre in elettroforesi ed incontra gradienti di denaturazione crescenti. Quando un frammento di DNA comincia ad aprirsi e si denatura forma delle strutture ramificate che ne impediscono l'ulteriore corsa nel gel, tale frammento si arresta così in regioni "discrete": i domini di denaturazione, appunto.

Dopo corsa il gel viene colorato e le bande evidenziate vengono tagliate o *excise* per essere sottoposte a sequenziamento. Il sequenziamento delle bande *excise* (dopo riamplicazione con gli stessi primers, ma senza *clamp GC*) permette poi l'identificazione del microrganismo che ha generato quella banda all'interno di comunità anche complesse.(91)

La tecnica DGGE è forse la tecnica di *fingerprinting culture independent* più utilizzata ed è stata ampiamente applicata nello studio di comunità microbiche ambientali e nella variazione delle stesse in risposta a variazioni ambientali. Tale tecnica è stata utilizzata per la prima volta in campo alimentare da Ampe *et al.* (1999) (92) in un lavoro in cui venne studiata la distribuzione spaziale dei microrganismi all'interno delle palline messicane "pozol" ovvero un impasto di mais fermentato. Soprattutto ultimamente la DGGE sta venendo sempre più impiegata nello studio di comunità di formaggi artigianali e Denominazione d'Origine Protetta. Le regioni dell'operone ribosomale studiate sono diverse, ma in genere soprattutto la V1, l'intero frammento V1-V3 o la sola V3 e talvolta l'intero frammento V6-V8.

Uno dei primi studi su formaggi artigianali è stato quello condotto da Randazzo *et al.* (2002) (93). In esso i ricercatori hanno preso in esame il formaggio Ragusano (DOP) prodotto in Sicilia ed hanno valutato i cambiamenti della comunità microbica nei diversi passaggi produttivi dal latte fino al formaggio finito (15 giorni di maturazione). Nello studio essi accoppiarono alla tecnica DGGE metodi *culture dependent*. La tecnica DGGE fu utilizzata sia sul DNA che sull'RNA (RT-PCR) al fine di valutare le specie microbiche metabolicamente attive. Le regioni

investigate mediante DGGE furono i frammenti da V6 a V8 e da V1 a V3. Quello che emerse da tale ricerca furono innanzitutto i profondi cambiamenti che intercorrevano all'interno della comunità da uno step produttivo all'altro, confermando la capacità della tecnica DGGE di visualizzare istantaneamente le dinamiche microbiche. Il successivo sequenziamento delle bande direttamente *excise* consentì inoltre di comprendere meglio come le diverse specie si distribuissero nei diversi tempi di produzione e maturazione. In particolare, i batteri lattici mesofili quali *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis* e *Macroccoccus caseolyticus* erano dominanti nel latte crudo mentre *Streptococcus thermophilus* prevaleva durante la fermentazione lattica. Invece altri batteri lattici termofili (quali *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus fermentum*) comparivano durante la maturazione. L'attività metabolica ottenuta dalla DGGE dopo RT-PCR mostrava attività metaboliche nettamente differenti fra i gruppi microbici individuati. I metodi colturali invece consentirono di individuare molte specie batteriche tuttavia, alcune come *Lactobacillus delbrueckii*, furono individuate solo grazie alla tecnica DGGE.

Tale studio confermò l'efficacia della tecnica DGGE nella ricerca dei componenti della comunità microbica del formaggio e ne mostrò l'utilità soprattutto se accoppiata a metodi colturali tradizionali poiché ne integrava la capacità di *detection*.

Più recentemente Dolci *et al.* (2008) (94) ha investigato le comunità microbiche che si trovano sulla crosta del formaggio DOP Fontina. Anche in questo studio sono stati accoppiati i metodi colturali tradizionali con la DGGE. La regione studiata è stata la V3 dell'operone ribosomiale 16s rDNA. In seguito all'analisi dei *clusters* dei profili ottenuti in DGGE in ciascuno dei due caseifici presi in esame era stato possibile stabilire che l'ambiente di maturazione così come gli utensili e le superfici a contatto con il formaggio influenzano e determinano differenze nella popolazione microbica della crosta del formaggio. In questo caso la DGGE si dimostrò una tecnica utile per caratterizzare la superficie di formaggi realizzati in realtà produttive differenti, tuttavia, i metodi colturali si rivelarono utili soprattutto per quantificare le specie microbiche effettivamente presenti sulla crosta.

In un altro studio condotto da Bonetta *et al.* (2008) (95) si è effettuata la caratterizzazione microbiologica di un formaggio artigianale DOP quale la Robiola di Roccaverano. In esso la regione dell'operone ribosomiale investigata era la V1. In tale studio sono stati messi a confronto i profili ottenuti dal formaggio prodotto in 4 caseifici tradizionali ed in uno industriale. Nei primi per la produzione del formaggio veniva utilizzato latte di capra crudo e veniva aggiunto caglio di vacca o di capra. Nel secondo invece si usava una miscela di latte di vacca e capra pastorizzato e si aggiungeva caglio di vacca e colture *starters*. Dopo analisi DGGE si è effettuata un'analisi di *clusters* dei profili ottenuti relativamente alla realtà produttiva (artigianale ed industriale) ed alla stagione di produzione (inverno, primavera, estate) e si è visto come alcune specie microbiche siano state ritrovate solo nei campioni di formaggio prodotti nei caseifici artigianali. Inoltre, in estate, si trovarono un maggior numero di *clusters*: uno per il

caseificio industriale e tre per quelli tradizionali presumibilmente perché le condizioni climatiche permettevano una maggiore differenziazione delle popolazioni microbiche di ciascun prodotto.

In un altro studio condotto da Van Hoorde *et al.* (2008) (96) viene esaminata la composizione della comunità microbica di due formaggi fiamminghi (simili al “Gouda”) prodotti da due diversi caseifici a partire da latte crudo di vacca. In questo studio la regione investigata è ancora la V3 all’interno dell’operone ribosomale 16S rDNA. In questo lavoro gli studiosi hanno accoppiato le analisi tradizionali (*culture dependent*) e la DGGE. I risultati di tale studio permisero di mettere in evidenza i limiti dei metodi colturali principalmente legati alla non selettività dei terreni disponibili (M17, MRS, KEA ma soprattutto LBS). Tuttavia si osservarono anche i limiti della tecnica DGGE: infatti è vero che questa metodica spesso consente di “detectare” specie che non vengono mai isolate ma, allo stesso tempo, accade di non rilevare bande corrispondenti a specie microbiche che sono state isolate in tutti i campioni di formaggio. Tale fenomeno viene giustificato con le possibili distorsioni che vengono introdotte da un metodo basato sulla PCR e dalle considerazioni che spesso la capacità di *detection* della DGGE è influenzata dalla diluizione su cui viene effettuata l’amplificazione, così come era già stato osservato da Ercolini *et al.* (2001) (97). Tale lavoro dunque confermò ancora una volta l’importanza di un approccio integrato nello studio di una comunità microbica dal momento che nessuna metodica riesce a fornire tutte le informazioni.

Ancora altri studi che rappresentano un esempio di impiego della tecnica DGGE sul formaggio sono stati condotti a conferma dell’efficacia di tale metodica come tecnica di fingerprinting.

Tuttavia tale tecnica presenta tutti i limiti delle altre che si basano sulla PCR. Inoltre, pur presentando il vantaggio della possibilità di un sequenziamento diretto delle bande *excise*, l’identificazione può essere ostacolata dal fatto che le piccole dimensioni dei frammenti prodotti di PCR caricate su gel possono non contenere sufficienti informazioni per una precisa classificazione tassonomica (98). E’ inoltre necessario considerare il fatto che segmenti genomici aventi diversa sequenza potrebbero avere identica mobilità elettroforetica portando alla comigrazione su gel di diversi frammenti (99). Un altro inconveniente spesso legato alla DGGE è la scarsa riproducibilità (100) determinata dalla preparazione manuale dei gel e dalla colorazione degli stessi oltreché dalla formazione di aspecifici durante l’amplificazione. La riproducibilità può essere aumentata utilizzando uno standard interno allo stesso gel e fra diversi gel (101,102). Un altro limite associato a tale tecnica è la bassa sensibilità dovuta alle operazioni di colorazione tradizionale effettuate sui gels che può portare alla perdita di bande che rappresentano gli ampliconi quantitativamente meno importanti all’interno della comunità. Per aumentare dunque la capacità di detection possono essere utilizzati anche primers con marcatori fluorescenti (103, 101).

1.10.6 STUDIO DI COMUNITÀ

Il termine biodiversità (o diversità biologica) si riferisce alla variabilità delle forme di vita che caratterizzano il nostro pianeta. Il modo più semplice (e sommario) di misurare la biodiversità di un sistema oggetto di studio, di qualunque natura esso sia, consiste nel contare le specie presenti. Il numero di specie (detto anche ricchezza di specie) rappresenta, però, soltanto un aspetto del concetto generale di biodiversità, che si manifesta a più livelli, comprendendo la diversità genetica all'interno di una stessa specie (biodiversità intraspecifica), la diversità delle specie appartenenti ad un ecosistema (biodiversità specifica) e la diversità degli ecosistemi (biodiversità ambientale).

La biodiversità riguarda, dunque, la diversità genetica all'interno di una popolazione, il numero e la distribuzione delle specie in un territorio, nonché la differenziazione degli ecosistemi all'interno di un ambiente.

Da una comunità microbica si possono ottenere diverse informazioni e precisamente, come anticipato precedentemente, oltre al numero di specie verosimilmente presenti all'interno di essa, le abbondanze relative delle diverse specie, cioè le percentuali con cui le varie specie sono presenti nella comunità, che concorrono a definire il grado di diversità di un ecosistema. Gli indici di diversità utilizzati in ecologia sono espressioni matematiche relative ai rapporti specie-importanza e vengono utilizzati per stimare le diversità delle specie presenti in una comunità, esprimendo con un unico valore sia la ricchezza che l'omogeneità. Uno dei più utilizzati è l'Indice di Shanon-Weaver (H'), un indice di diversità usato in statistica nel caso di popolazioni con un numero infinito di elementi. Tale indice di diversità è derivato dalla teoria dell'informazione la cui nascita è relativamente recente: essa viene solitamente fatta risalire al 1948, anno in cui Claude Shannon pubblicò una "Teoria matematica della comunicazione" in cui introduceva, per la prima volta, in modo sistematico lo studio dell'informazione e della comunicazione. Margalef (1958) è stato il primo ad applicare questi concetti alle discipline ecologiche. In particolare l'Indice di Shanon-Weaver è definito come segue:

$$H' = - \sum_{j=1}^S p_j \log_2 p_j$$

In cui p_j è dato dalla proporzione della j -esima specie, ovvero

$$p_j = S_j / S \quad \text{in cui}$$

S_j = numero di organismi nella comunità che appartengono alla specie j

S = numero totale delle specie.

Il logaritmo è in base 2 ed è semplicemente dovuto a ragioni storiche (l'uso dei bit nell'ambito della teoria dell'informazione). L'indice di Shannon è uguale a zero quando all'interno della comunità vi è una sola specie ed il suo valore massimo è uguale a $\log_2 S$ quando tutte le specie hanno la stessa abbondanza ovvero tutte le specie sono equidistribuite. Al fine di poter comparare invece la diversità di due popolazioni distinte che racchiudono differenti numeri di specie si utilizza l'indice di Equiripartizione (o *evenness*), che è uguale al rapporto fra la diversità reale H' e la diversità massima ($\log_2 S$):

$$E = H' / \log_2 S$$

L'indice di equiripartizione, su una scala da 0 a 1, dicono quanto una comunità, a prescindere dal numero di specie che contiene, si avvicina al caso ideale della perfetta equiripartizione. Dunque tende a 0 quando una specie domina largamente la popolazione, mentre tende ad 1 quando tutte le specie hanno la stessa abbondanza. Maggiore è l'equiripartizione di una comunità, maggiore è la sua diversità.

2. SCOPO

Tra le diverse produzioni alimentari “tradizionali” italiane un posto di rilievo hanno i prodotti caseari. Attualmente sul territorio nazionale sono presenti molti prodotti artigianali il cui processo produttivo non è standardizzato o regolamentato da uno specifico disciplinare. Inoltre per la loro realizzazione non vengono impiegati fermenti lattici commerciali o “starter” ma la trasformazione e maturazione sono prodotte dalla popolazione microbica naturalmente presente nel latte. Tale microflora proviene dall’ambiente in cui il latte viene raccolto ed il formaggio viene prodotto pertanto essa può essere a ragione considerata come un’impronta che l’ambiente di produzione e di lavorazione del latte lascia sul prodotto finito. Questo aspetto fa sì che il prodotto artigianale abbia caratteri sensoriali tipici e che la peculiarità sia esclusiva di ogni singola realtà produttiva. Quanto detto, se è valido per i prodotti caseari di origine vaccina, assume ancora maggiore importanza per quelli caprini. Tali prodotti, dimenticati per lungo tempo proprio per le loro pressoché uniche caratteristiche sensoriali, non sempre gradite, sono stati di recente rivalutati e stanno assumendo sempre maggiore importanza nella dieta anche grazie alle loro caratteristiche nutrizionali.

Alla luce di queste valutazioni lo scopo del lavoro intrapreso è stato in prima istanza quello di valutare la qualità microbiologica di formaggi ottenuti da latte crudo caprino provenienti da tre differenti caseifici siti in Valsesia nella provincia di Vercelli. In secondo luogo l’obiettivo era stato quello di caratterizzare, a livello di specie, la microflora lattica autoctona coinvolta nella produzione e maturazione, analizzando sia la diversità all’interno della comunità microbica sia la dinamica di sviluppo durante il processo di trasformazione del latte in formaggio.

A tal fine sono stati utilizzati due approcci:

- Un approccio *culture dependent* che è consistito nell’isolamento su terreni selettivi e differenziali dei microrganismi presenti sul formaggio seguito dal sequenziamento del 16S degli isolati per l’identificazione;
- Ed un approccio *culture independent* mediante le seguenti tecniche: LH-PCR (Length heterogeneity-PCR) analysis, ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Analysis), SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism), DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis).

Accanto quindi a tecniche di indagine microbiologica tradizionale (conte in piastra, terreni selettivi e differenziali, visione al microscopio, ecc.) si è utilizzata la microbiologia

molecolare (sequenziamento 16S rDNA e tecniche basate sulla PCR). Da questo è derivato un ulteriore obiettivo ovvero quello di valutare l'efficacia nel descrivere un ecosistema microbico complesso come il formaggio di capra che caratterizza ciascuna metodica utilizzata.

3. MATERIALI E METODI

Sono stati oggetto di studio le produzioni di latte caprino di tre realtà artigianali siti in Valsesia.

3.1 LA VALSESIA

La Valsesia è una valle alpina situata in Piemonte, nella parte settentrionale della provincia di Vercelli, percorsa dal fiume Sesia da cui prende il nome. Estesa per circa 760 km² dal Monte Rosa sino alle pianure vercellesi, presenta un'altitudine variabile tra i 250 e i 4554 m s.l.m. ed è composta da una valle principale, la Val Grande, e due valli minori Val Sermenza e Val Piccola. I comuni maggiori sono Varallo e Borgosesia.

Le attività economiche più sviluppate, oltre al turismo sia invernale che estivo, sono rappresentate dall'industria metalmeccanica e dal tessile. Le caratteristiche geografiche del territorio e la presenza di numerose aree disponibili al pascolo ha da sempre reso l'allevamento una attività importante e significativa per il territorio: la produzione di formaggi ne è uno dei cardini. Molto nota è la Toma della Valsesia, prodotta con latte vaccino intero crudo; ma altrettanto interessanti sono le produzioni ottenute con latte di capra puro o in miscela con il vaccino.



Figura 10: Posizione geografica della Valsesia.



Figure 11: Immagini della Valsesia.

3.2 TIPOLOGIA DEI CASEIFICI: PROCESSO PRODUTTIVO E STRUTTURA DEL FABBRICATO

I caseifici presi in esame durante questo lavoro di tesi sono stati tre. Uno è sito a fondovalle, nel paese di Carcoforo (VC), mentre gli altri due sono alpeggi raggiungibili a piedi e con fuoristrada, rispettivamente in località Cangelo ed Alpe Mera. Nei tre caseifici sono allevate capre ibride e tutta la lavorazione del latte, mungitura compresa, è condotta manualmente e

artigianalmente. Il latte lavorato è quello refrigerato proveniente dalla mungitura serale e mattutina ed è impiegato crudo.

3.2.1 CARCOFORO

Il caseificio è situato in paese, lungo la strada principale. L'edificio, di tre piani, ospita un unico locale di produzione al pianoterra ove avvengono tutte le fasi di produzione. Lo stesso locale è adibito anche alla stagionatura di salami e alla vendita dei prodotti.

Tutta la lavorazione avviene manualmente in modo artigiano ed è effettuata da un singolo operatore, questa si svolge secondo il diagramma di flusso riportato (Figura 22). Il latte refrigerato o no proveniente da una o due mungiture viene trasportato nel locale di produzione dalla stalla (ove avviene la mungitura, manuale) attraverso il cortile. Il latte viene versato dai secchi nella caldaia in alluminio in attesa di essere riscaldato mediante gas Gpl (Figura 12).



Figura 12: Caseificio di Carcoforo, bruciatore a GPL e caldaia di alluminio con latte.

Raggiunta la temperatura di 33°C viene aggiunto il caglio: è un caglio commerciale in pasta (Carappelli di forza 1:10.000) che viene diluito dall'operatore. La concentrazione di caglio aggiunta è 20cc ogni 100 litri di latte e viene dosato con una siringa di plastica che viene riutilizzata e lavata con sola acqua dopo ogni lavorazione (Figura 13). La coagulazione avviene in circa 15-20 minuti.

Figura 13: Siringa di plastica.



Trascorso questo tempo viene effettuato un primo taglio con coltello (Figura 14 e 15) ed un secondo con le mani (Figura 16).

Figura 14: Taglio con coltello. Figura 15: Cagliata rotta.



Figura 16. Taglio manuale.



Il siero che si raccoglie in superficie viene asportato manualmente con secchi di plastica e raccolto per l'alimentazione dei suini (Figura 17).

Figura 17: Raccolta siero.



Alla cagliata viene aggiunta acqua calda alla temperatura di circa 50°C allo scopo di effettuare una sorta di cottura della cagliata che raggiungerà la temperatura di circa 36-37 °C ed assumerà così un sapore più dolce. Il siero che si forma nuovamente viene ulteriormente asportato per evitare che riscaldandosi acidifichi troppo e porti all'ottenimento di una pasta troppo dura.

A questo punto i grani di caglio sono ben separati e verranno trasferiti con le mani dall'operatore all'interno dei cestelli in plastica (Figura 18). L'addetto effettua durante la formatura nel cestello una leggera pressione.

Figura 18. Fasi della formatura.





I cestelli riempiti vengono posti su di una griglia sotto la quale è posta dell'acqua calda e ricoperti con un telo di nylon. Quest'operazione ha l'effetto di una stufatura e durante il tempo di permanenza in tale fase (3-4 ore) le forme vengono rivoltate 2-3 volte (Figura 19).

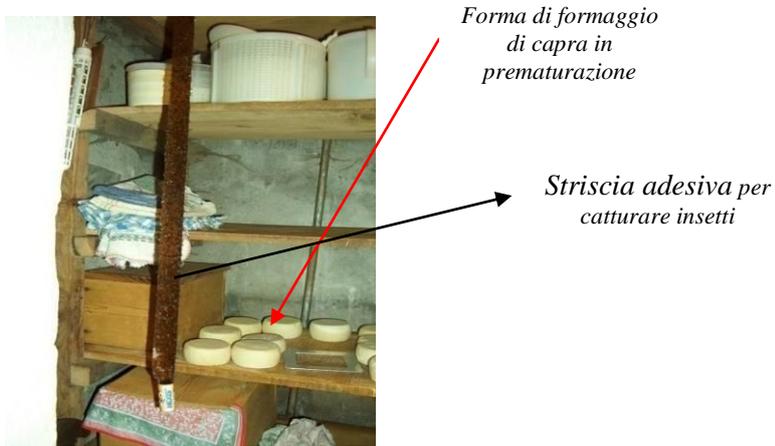
Figura 19: Stufatura.



Dopo stufatura le forme vengono trasferite in salamoia realizzata in una bacinella di plastica bianca collocata all'interno della cella di maturazione. La salamoia viene preparata con acqua di rete cui viene aggiunto sale grosso in ragione del 20% , la salamoia viene rinnovata ogni 2 mesi.

Le forme rimangono in salamoia per circa 2 ore e successivamente vengono trasferite nella cella di maturazione (U.R. 70% e $T=10-15^{\circ}\text{C}$) alla quale si accede dal locale di produzione. Il formaggio poggiato su assi di abete bianco rimane qui per circa 2 giorni. In questa cella di maturazione sono posti anche salami e formaggi di vario tipo, inoltre viene utilizzata come una sorta di magazzino per depositare bacinelle ed altro (Figura 20).

Figura 20: Particolare cella di prematurazione.



Infine le forme vengono trasferite nella cella di maturazione vera e propria (10-12°C e U.R.=80%) che si trova all'esterno del locale di produzione. La maturazione ha una durata minima di 20 giorni (Figura 21).

Figura 21: Cella di maturazione.



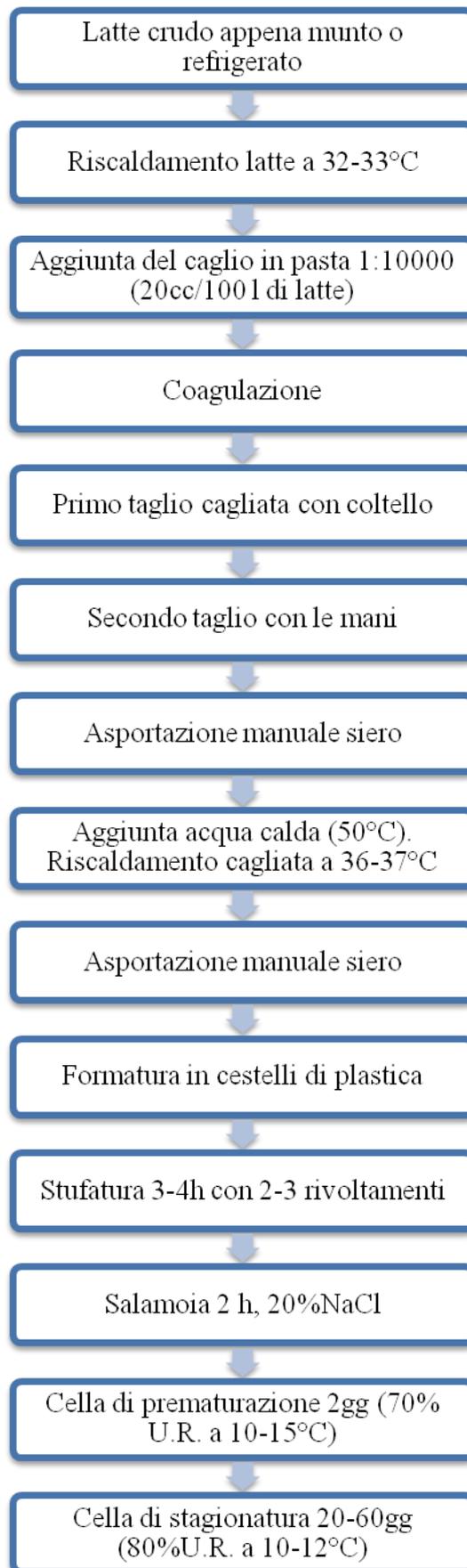


Figura 22: Processo di produzione del caseificio di Carcoforo.

CARATTERISTICHE STRUTTURALI DEL FABBRICATO

Locale di lavorazione

Al locale di lavorazione si accede direttamente dall'esterno, attraverso una porta metallica con la parte superiore vetrata, per illuminare il locale con luce naturale (Figura 20). Il locale presenta pavimento e pareti (fino a circa 2,20 metri) piastrellate di colore chiaro. La restante parte di pareti e soffitto è in intonaco civile tinteggiato di bianco. Tutti i raccordi (pareti-pavimento e pareti-pareti) sono a spigolo vivo. Il locale è illuminato da una lampada al neon posta al centro del locale.

Nel locale ci sono due caldaie, una in rame e acciaio (per lavorare il latte di vacca) e l'altra in alluminio (per lavorare il latte di capra), un tavolo da lavoro in acciaio inox, una piccola zangola, un bancone in acciaio inox per la vendita dei prodotti e un lavabo in acciaio inox (ed altre attrezzature da cucina). Le caldaie sono posizionate in un camino e sono riscaldate a gas. Mediamente una bombola di gas da 20 kg dura 1,5 mesi (per la trasformazione casearia). Dal locale di lavorazione si accede all'abitazione sita al primo piano ed al locale di asciugatura (ventilazione forzata).

Locale di asciugatura

Il locale di asciugatura ha il pavimento piastrellato e le pareti e il soffitto in intonaco grezzo. Non ha finestre, l'unica porta di accesso è in metallo con la parte superiore vetrata per illuminare naturalmente il locale che funge anche da piccolo magazzino. Il locale è ventilato meccanicamente (ventilatore) per asciugare le forme disposte su scaffali in legno.

Cella di stagionatura

È una cella in PVC coibentato con pavimento piastrellato. Lungo il perimetro sono disposti gli scaffali di stagionatura con le assi in legno.

Le forme stagionano da 20 giorni a 2 mesi in condizioni microclimatiche variabili a seconda della stagione:

- estive: 11°C – 90-95%
- invernali: 13° – 90-95%

3.2.2 CANGELLO

Alpeggio raggiungibile solo a piedi, a circa 1364 m s.l.m. e non delimitato da mura perimetrali. In questo piccolo caseificio si lavora latte vaccino e caprino. I formaggi vengono venduti a rivenditori locali o impiegati in cucina nel ristorante di proprietà della famiglia. La produzione del tomini di capra generalmente viene effettuata prima di quella dei formaggi vaccini secondo lo schema riportato in Figura 31.

La mungitura viene effettuata mattina e sera all'aperto e solo in caso di pioggia in stalla. Per la produzione viene utilizzato il latte proveniente da due mungiture (sera-mattina) che, trasportato nel locale di produzione dall'esterno, viene versato dai secchi nella caldaia in rame in attesa di essere riscaldato mediante gas.

Raggiunta la temperatura di 33°C viene addizionato il caglio (caglio commerciale liquido Clerici), in ragione 8-15 cc ogni 100 litri dosato con un cucchiaino (un cucchiaino raso per 70/80L di latte). La coagulazione avviene in circa 45- 60 minuti. Al termine viene effettuata la rottura della cagliata mediante attrezzi appositi o alternativamente con le mani (Figura 23).



Figura 23: Rottura manuale della cagliata.

L'operatore immerge il braccio nel paiolo di rame e mescolando in continuazione rompe la cagliata. Segue un ulteriore riscaldamento così che la massa passa da una temperatura di 30 °C ad una di 35 °C circa.

A questo punto si ha la formatura: i cestelli in plastica vengono immersi direttamente all'interno del paiolo di rame per raccogliere i fiocchi della cagliata (Figure 24).





Figure 24: Fasi della formatura.

I cestelli riempiti senza esercitare pressione sul contenuto vengono posti a spurgare su di un tavolo in acciaio inox o su un piano di legno inclinato che consente il drenaggio e la raccolta del siero in un secchio; il siero servirà per la preparazione della ricotta e per l'alimentazione dei maiali (Figure 25 e 26).



Figura 25: Spurgo del siero su tavolo inox.

Piano per spurgo



Figura 26: Spurgo del siero su tavole in legno.

Le forme sono coperte con un telo di carta e vengono girate due volte (Figura 27).



Figura 27: Forme coperte

Il mattino successivo vengono trasferite su di un asse di maturazione che si trova sul balcone esterno in maniera tale da subire una prima “asciugatura” che favorisce una maggiore consistenza del prodotto finito. Qui le forme stazionano per circa 24 ore (Figura 28).



Figura 28: Maturazione su assi di legno.

Trascorso questo tempo vengono immerse in salamoia (acqua e sale in una bacinella di plastica nel locale di stagionatura) dove rimangono per circa 3 ore (Figura 29).



Bacinella salamoia

Figura 29: Salamoia.

Infine il formaggio viene posto sulle assi della cella di maturazione dove rimane per circa una settimana/10 giorni (Figura 30).



Rete antinsetto

Figura 30: maturazione su assi di legno.

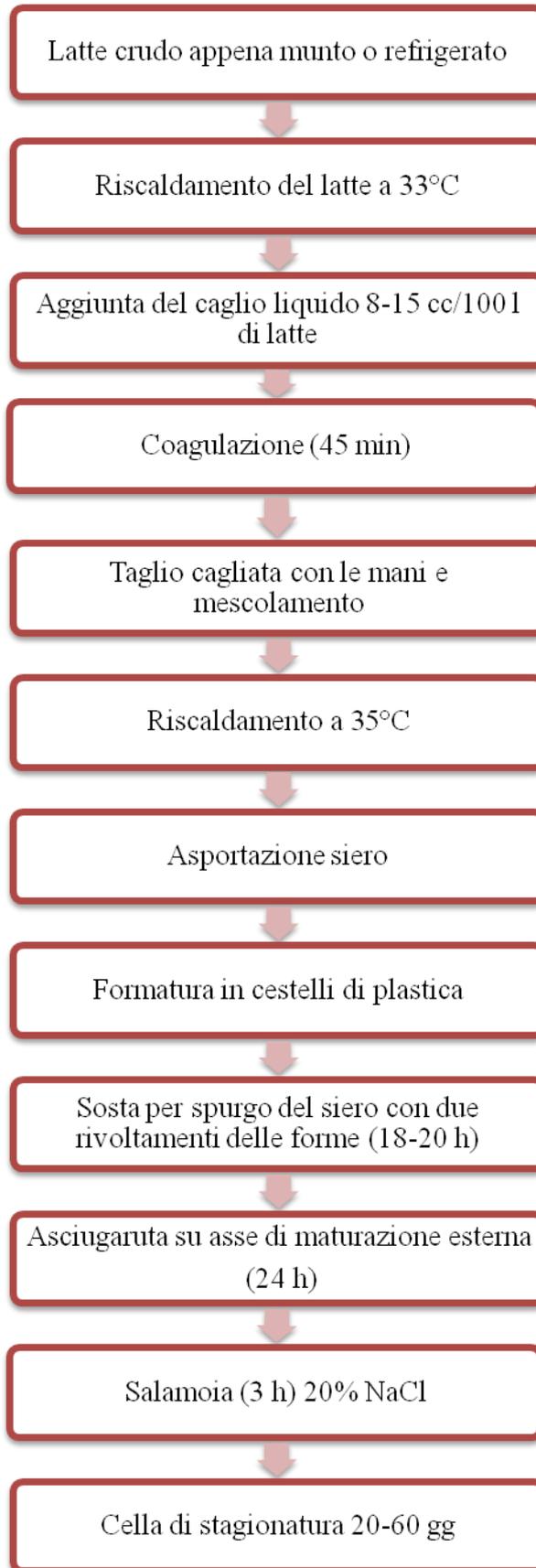


Figura 31: Processo di produzione del caseificio di Cingello.

CARATTERISTICHE FABBRICATI (Figura 32)

Locale di lavorazione

La pavimentazione è in PVC ed è stata sovrapposta sulla pavimentazione pre-esistente. Le pareti sono realizzate in pannelli di PVC e sono raccordate tra loro, al pavimento e al soffitto con scossaline metalliche. Il soffitto è in legno. La zona retrostante la caldaia (camino) è rivestita da una lastra metallica. A lato della caldaia c'è l'unica finestra presente nel locale con telaio in legno e dotata di rete anti-insetti a maglia larga esternamente e a maglia fine internamente.

Al locale di lavorazione si accede da un primo locale utilizzato come deposito attrezzature. Il locale di lavorazione comunica con il locale di salatura e prima stagionatura e con il ballatoio esterno (lobbia) dove le forme vengono lasciate asciugare per 24 ore. Dal ballatoio esterno si accede ai servizi igienici. Le porte sono in legno. All'interno del locale vi è un lavabo in acciaio inox.

È presente nel locale una lampada al neon posta sulla parete vicino la porta d'ingresso.

Nel locale sono presenti due caldaie in rame e un tavolo in acciaio per lo spurgo delle forme e due in legno per lo spurgo e il riposo delle forme (coperte). Le attrezzature di caseificazione sono in acciaio e plastica per uso alimentare.

Locale di salatura e prima stagionatura

Dal locale di lavorazione si accede al locale di maturazione che presenta tre pareti intonacate e tinteggiate di bianco ed una in legno. Il pavimento e soffitto sono in legno. La finestra e la porta di accesso al locale presentano telaio in legno. La finestra è dotata di rete anti-insetto a maglia larga.

Nel locale sono presenti una vasca in plastica per la salatura delle forme e diverse assi di legno (sospese al centro del locale) su cui vengono poste a maturare le forme.



Figure 32: Cangello. a: malga vista dall'esterno. b: locale lavorazione.

3.2.3 ALPE MERA

Alpeggio isolato di piccole dimensioni, a conduzione familiare, raggiungibile anche con mezzi fuoristrada e con attività di ristorazione.

La lavorazione artigianale viene effettuata da un singolo operatore secondo lo schema riportato in Figura 44.

Durante la lavorazione entrano ed escono dal locale i figli dei proprietari mentre l'eventuale vendita dei prodotti viene effettuata in un locale dedicato ben separato al quale si accede sempre dal porticato. Ogni giorno vengono lavorati circa 30/40 litri di latte caprino. Le tipologie di formaggio preparato sono due: caprino e toma di capra, mentre con il siero ottenuto durante la caseificazione viene prodotta quotidianamente ricotta di capra, il siero esausto è destinato all'alimentazione dei suini. Il latte proveniente da due mungiture (sera e mattina) viene trasportato nel locale di produzione dalla stalla dove avviene la mungitura manuale effettuata previa disinfezione delle mammelle. Il latte viene versato dai secchi nella caldaia in rame su cui è posto un colino tramite il quale viene effettuata una filtrazione. Segue un riscaldamento mediante gas che porta il latte ad una temperatura di circa 35°C (figure 33 e 34).

Raggiunta tale temperatura al latte viene aggiunto il caglio. Il caglio utilizzato è in polvere di tipo commerciale (Paride-Venturelli, forza 1:100.000): esso viene utilizzato seguendo le istruzioni del produttore (1 misurino ogni 100/125/150 litri di latte). Il tempo di coagulazione è variabile (30 minuti -1 ora) in funzione della quantità di caglio aggiunto.



Figure 33 e 34: Prime fasi della lavorazione effettuate in caldaia di rame.

Trascorso questo tempo viene effettuata la rottura della cagliata a mano o mediante coltello; segue un tempo di sosta di circa 15 minuti e quindi un ulteriore riscaldamento a 37-39°C. La cagliata sosta a tale temperatura per un tempo di circa 10 minuti necessario per ottenere il deposito dei fiocchi sul fondo del paiolo. I fiocchi della cagliata vengono estratti manualmente dal fondo della caldaia e posti all'interno dei cestelli di plastica appoggiati su un tavolo in acciaio inox a piano inclinato per facilitare lo spurgo ed il drenaggio del siero dalle forme (Figure da 35 a 40) .





Figure da 35 a 40: Figure delle diverse fasi di lavorazione: dalla cagliata allo spurgo del siero.

Al termine della formatura le forme vengono trasferite su assi di abete bianco (poste all'interno del locale di produzione) a spurgare per circa 24 ore (Figura 41).



Figura 41: Spurgo delle forme su assi di abete.

Trascorso questo tempo le forme sono poste in salamoia (10% NaCl) dove sostano per circa 6 ore. La stessa salamoia ospita prodotti ottenuti sia con latte vaccino che caprino (Figura 42).



Bacinella salamoia

Figura 42: Salamoia.

Dopo la salamoia il formaggio viene spostato su griglie sospese al di sopra della vasca contenente la soluzione salina al fine di ottenere una sgocciolatura del liquido, qui viene lasciato per una notte. La mattina successiva le forme vengono trasferite su assi di abete bianco (poste al di sopra delle precedenti) dove sostano per circa 6-12 ore al fine di ottenere una prima asciugatura prima di essere portate in cantina dove viene realizzata la maturazione vera e propria (Figura 43). Questa operazione è importante per evitare ammuffimenti sugli assi di stagionatura della cantina.



Figura 43: Stagionatura delle forme.

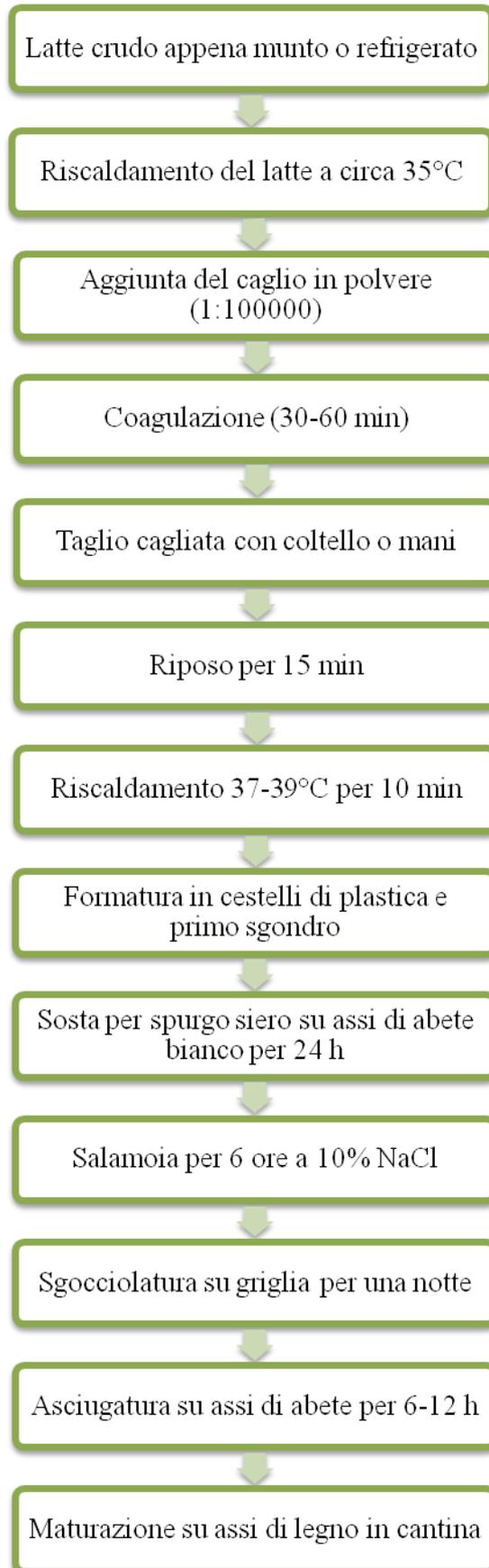


Tabella 44: Processo di produzione caseificio di Alpe Mera.

CARATTERISTICHE FABBRICATI

Il complesso produttivo in alpeggio risale al 1978, ma è stato ristrutturato nel 2006. La struttura isolata in mezzo ad un prato è priva di cintura perimetrale intorno al fabbricato. al pianoterra si trova la stalla, i locali di lavorazione, vendita e ristorazione, al primo piano l'abitazione ed al piano inferiore la cantina di stagionatura, una toilette per i clienti del ristorante e una dispensa. Tutti i locali sono ben suddivisi tra loro da porte metalliche, mantenute rigorosamente chiuse.

La struttura è collegata all'acquedotto comunale ed è allacciata alla rete elettrica.

Locale di lavorazione

Il locale di lavorazione presenta pareti piastrellate chiare sino all'altezza di 2 m, il resto delle pareti è in intonaco civile tinteggiato di bianco come il soffitto. La parete esterna è in legno e comprende un'ampia finestra protetta da rete anti-insetti. Le vetrocamere sono di sicurezza (contengono una rete metallica al loro interno) e contengono veneziane oscuranti. Il pavimento, di colore chiaro, è piastrellato in grès antiscivolo. I raccordi parete-parete e parete-pavimento sono a spigolo vivo. La porta di accesso al locale è in metallo con ampio riquadro in vetro ad altezza volto. L'illuminazione artificiale è data da una lampada al neon posta al centro del locale. Al centro del locale è presente un pozzetto per lo scarico delle acque di produzione con grigliato in plastica.

Il locale è dotato di due caldaie, una in rame per la lavorazione del latte di capra ed una in rame-acciaio inox per la lavorazione del latte vaccino, una cappa (non in funzione durante la lavorazione), un tavolo in acciaio inox per lo spurgo delle forme e un lavabo in acciaio a pedali con acqua calda/fredda. Lo spino è in acciaio, mentre i cestelli per la formatura sono in plastica alimentare. I riscaldamenti delle caldaie è a gas.

Locale di stagionatura

Il locale di stagionatura è stato ricavato nel sottosuolo. Il pavimento è in beole, le pareti e il soffitto sono intonacate. La porta è in metallo verniciato. La superficie del locale è di circa 4 m².

Nel locale sono presenti scaffalature in legno per la maturazione dei formaggi.

L'illuminazione è realizzata con una luce ad incandescenza posta al centro del locale (55 lux, senza luce 44 lux).

3.3 CAMPIONI ALIMENTARI: ANALISI MICROBIOLOGICHE

Presso ciascuna realtà produttiva sono stati effettuati prelievi in diversi momenti della produzione dalle materie prime (latte appena munto) al prodotto finito (formaggio pronto al consumo).

Su ciascun campione sono stati ricercati i seguenti indici microbiologici:

- Carica batterica totale,
- Contaminanti,
- Lattici totali,
- Cocchi lattici,
- Enterococchi,
- Coliformi totali e fecali,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (latte e prodotto finito),
- Spore di clostridi (latte),
- Lieviti e muffe.

PREPARAZIONE CAMPIONI

I campioni prelevati nelle diverse realtà produttive sono stati trasportati in giornata in laboratorio con l'ausilio di borse termiche per allestire le analisi microbiologiche in accordo con la norma FIL IDF 122:2001 ISO 8261.

Per ciascun campione alimentare pervenuto in laboratorio refrigerato sono stati prelevati e pesati sterilmente in un sacchetto sterile 10 grammi di prodotto, successivamente addizionati di diluente sterile sale triptone in ragione di 1:10 ed omogeneizzati in "Stomacher 400 Circulator" a 260 rpm per 2-3 minuti. Mediante tecnica delle diluizioni decimali sono stati quindi eseguiti i piastramenti negli idonei terreni colturali.

TERRENI

Carica Batterica Totale (CBT)

Terreno di coltura impiegato: Agar Plate Count (APC) (104).

| | |
|----------------------------|----------------|
| Triptone | 5,0 g |
| Estratto di lievito | 2,5 g |
| Glucosio | 1,0 g |
| Agar | 20 g |
| Acqua distillata | 1000 ml |
| pH | 7 |

Sterilizzazione a 121°C per 15 minuti.

Semina per incorporamento e incubazione a 30°C per 48-72 ore.

Contaminanti

Terreno di coltura impiegato: Agar Gelisato

| | |
|---------------------|-------|
| Peptone di gelatina | 8,0 g |
|---------------------|-------|

| | |
|------------------|---------|
| Agar | 15,0 g |
| Acqua distillata | 1000 ml |

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 30°C per 48 ore.

Coliformi Totali e Fecali

Terreno di coltura impiegato: Violet Red Bile Agar (VRB) (105).

| | |
|---------------------|---------|
| Estratto di lievito | 3,0 g |
| Peptone | 7,0 g |
| Rosso neutro | 0,03 g |
| NaCl | 5,0 g |
| Lattosio | 10,0 g |
| Sali di bile | 1,5 g |
| Cristal violetto | 0,002 g |
| Agar | 15,0 g |
| pH | 7,4 |

Semina in doppio strato e incubazione a 37°C e 44°C per 24 ore per la ricerca rispettivamente dei coliformi totali e fecali.

Batteri lattici totali

Terreno di coltura impiegato: Man Rogosa Sharpe Agar (MRS) (106).

| | |
|---------------------------------|--------|
| Peptone | 10,0 g |
| Estratto di lievito | 5,0 g |
| Estratto di carne | 10,0 g |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Glucosio | 20,0 g |
| K ₂ PO ₄ | 2,0 g |
| Sodio acetato 3H ₂ O | 5,0 g |
| Citrato diammonico | 2,0 g |
| Soluzione A | 5,0 ml |
| Agar | 18,0 g |
| Acqua distillata | 1000ml |
| pH | 6,6 |

Soluzione A: MgSO₄ 11,5 g

MnSO₄*4H₂O 2,4 g

Semina per incorporamento e incubazione in anaerobiosi (GAS PACK) a

30°C per 48 ore.

Batteri lattici omofermentanti ed eterofermentanti

Terreno di coltura impiegato: Homo-Heterofermentative differential (HHD) (107).

| | |
|---------------------------------|---------|
| Fruttosio | 2,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,5 g |
| Triptone | 10,0 g |
| Phitone | 1,5 g |
| Acido casamino | 3,0 g |
| Estratto di lievito | 1,0 g |
| Tween 80 | 1,0 ml |
| Verde bromocresolo | 20,0 ml |
| Agar | 20,0 g |
| Acqua distillata | 1000ml |
| pH | 7,0 |

Semina per spatolamento superficiale e incubazione in anaerobiosi(GAS PACK) a 30°C per 48 ore. Le colonie di ceppi omofermentanti cresceranno di colore blu-verde, mentre le colonie di quelli eterofermentanti si presenteranno bianche.

Cocchi Lattici

Terreno di coltura impiegato: M17

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Triptone | 2,5 g |
| Peptone | 2,5 g |
| Peptone di soia | 5,0 g |
| Estratto di lievito | 2,5 g |
| β-glicerofosfato di Na | 19,0 g |
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0,25 g |
| Estratto di carne | 5,0 g |
| Acido ascorbico | 0,5 g |
| Agar | 18,0 g |
| Acqua distillata | 1000 ml |
| pH | 7,0 |

Al momento dell'uso aggiungere sterilmente, per ogni 100 ml di terreno fuso e tenuto a 50°C, 5 ml di soluzione di lattosio al 10% in acqua (sterilizzata separatamente per filtrazione). Semina per incorporamento ed incubazione a 30°C per 48 ore

Enterococchi

Terreno di coltura impiegato: Kanamicina Esculina Azide Agar (KEA) (108).

| | |
|---------------------|---------|
| Peptone di caseina | 20,0 g |
| Estratto di carne | 5,0 g |
| NaCl | 5,0 g |
| Kanamicina solfato | 0,02 g |
| Esculina | 1000 ml |
| Citrato triammonico | 0,5 g |
| Agar | 15,0 g |
| pH | 7,1 |

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 48 ore. Considerare solo le colonie nere con alone bruno-nero.

Micrococcaceae

Terreno di coltura impiegato: Mannitol Salt Agar (MSA)

| | |
|-------------------|---------|
| Estratto di carne | 1,0 g |
| Peptone | 10,0 g |
| Mannitolo | 10,0 g |
| NaCl | 75,0 g |
| Rosso fenolo | 0,025 g |
| Agar | 15,0 g |
| Acqua distillata | 1000 ml |
| pH | 7,5 |

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 48 ore. Le colonie di Micrococcaceae cresceranno gialle con alone giallo.

Staphylococcus aureus

Terreno di coltura impiegato: Baird-Parker (BP) (109).

| | |
|---------------------|--------|
| Tryptone | 10,0 g |
| Estratto di carne | 5,0 g |
| Piruvato di sodio | 10,0 g |
| Estratto di lievito | 1,0 g |

| | |
|------------------|---------|
| Glicina | 12,0 g |
| Cloruro di litio | 5,0 g |
| Agar | 20,0 g |
| Acqua distillata | 1000 ml |
| pH | 6,8 |

Al momento dell'uso aggiungere asetticamente un'emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio in ragione di 5ml/100ml di terreno, miscelare delicatamente, evitando la formazione di schiuma, e versare in piastra. Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 37°C per 48 ore.

Lieviti e muffe

Terreno di coltura impiegato: Yeast Glucose Cloramfenicolo (YGC)

| | |
|---------------------|---------|
| Estratto di lievito | 5,0 g |
| Glucosio | 10,0 g |
| Cloramfenicolo | 0,1 g |
| Agar | 18,0 g |
| Acqua distillata | 1000 ml |
| pH | 5,5 |

Semina per spatolamento superficiale e incubazione a 30°C per 3-5 giorni.

Terreno selettivo per crescita muffe e lieviti: Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)

| | |
|---------------------|-----|
| Estratto di lievito | 1% |
| Peptone | 2% |
| Glucosio | 2% |
| pH | 5,5 |

Salmonella spp. (110)

La Ricerca delle Salmonelle negli alimenti non è mai una conta, ma una valutazione di presenza/assenza in una stabilita quantità di alimento (25 g o ml).

Il metodo classico (Gazzetta Ufficiale 346 del 13/12/1978) consta di quattro fasi:

1. Fase di prearricchimento: acqua peptonata tamponata a pH 7. Incubare a 37°C per 24h.
2. Fase di arricchimento selettivo Trasferimento di 1 o 0,1 ml di prearricchimento in brodo Rappaport-Vassidialis contenenti sostanze selettive che favoriscono la crescita di microrganismi di tipo intestinale. Incubare a 42°C per 24-48h

3. Fase di conferma su terreno selettivo e differenziale: striscio su terreno Salmonella Shigella Agar (SSA). Non si sterilizza. Salmonella cresce formando caratteristiche colonie piccole diafane (lattosio negative) talvolta con centro nero (produzione di H₂S).

4. Prove di conferma: API test 20E (Biomérieux).

Listeria monocytogens (111)

Anche per Listeria si esegue una ricerca qualitativa in 25 g di prodotto. I passaggi sono:

- 1.Pre-arricchimento selettivo: 25 g di campione sono posti sterilmente in 225 ml di terreno di Fraser ½ concentrazione, incubazione a 30°C per 24 ore.
- 2.Arricchimento selettivo : trasferimento di 1 ml di prearricchimento in 10 ml di Fraser a concentrazione normale, incubazione a 37°C per 48 ore.
- 3.Prova di conferma in terreni differenziali e selettivi: In caso di annerimento della brodocoltura striscio su terreno selettivo differenziale ALOA (30°C per 48-72 ore).

3.4 ISOLAMENTO DEI CEPPI

Per ogni piastra è stato isolato il 20% delle colonie cresciute nelle piastre corrispondenti all'ultima diluizione. Le colonie isolate da APC, BP, VRB, MSA, sono state seminate in Tryptic Soy Broth (TSB) e, dopo incubazione a 30°C per 24-48 ore sono state strisciate, sul corrispondente terreno agarizzato (TSA) sterile, preparato in provette a "becco di clarino". Gli slant così ottenuti sono stati incubati a 30°C per 24-48 ore.

Tryptic Soy Broth (TSB):

| | |
|--------------------|---------|
| Tryptone | 17,0 g |
| Soitone | 3,0 g |
| Destrosio | 2,5 g |
| Cloruro di Sodio | 5,0 g |
| Dipotassio fosfato | 2,5 g |
| Acqua distillate | 1000 ml |
| pH | 7,3 |

Incubare a 30°C per 24-48 ore.

Le colonie isolate da KEA sono state isolate in provette di BHI broth avente la seguente composizione:

Brain Heart Infusion (BHI):

| | |
|-------------------------------|---------|
| Infuso di cervello di vitello | 200,0g |
| Infuso di cuore di manzo | 250,0 g |
| Peptone | 10,0 g |
| Destrosio | 2,0 g |
| NaCl | 5,0 g |
| Fosfato disodico | 2,5 g |
| pH | 7,4 |

Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Semina e incubazione a 37°C per 24-48 ore.

Le colonie di eumiceti sono state isolate su slant a “becco di clarino” di YGC.

Gli isolati da MRS e da HHD sono stati seminati in provette di MRS broth ed incubate a 30°C per 24-48 ore.

Allo stesso modo le colonie isolate da M17 sono state seminate in provette di M17 broth, incubate a 30°C per 24-48 ore e strisciate sul corrispondente terreno agarizzato.

Al fine di verificarne la purezza tutti gli isolati sono stati ripetutamente strisciati sui corrispondenti terreni agarizzati e re-isolati. Tutti i ceppi isolati sono stati poi sottoposti ad osservazione al microscopio ottico 480x per verificare un eventuale contaminazione, mobilità e morfologia, informazioni utili per la classificazione.

3.5 CONSERVAZIONE ISOLATI

Tutti i batteri lattici isolati in MRS e M17 brodo sono stati congelati. Da ogni isolamento è stato prelevato 1,5 ml di coltura, addizionato di 0,3 ml di glicerolo, posto in provette monouso sterili di plastica e congelati a -25°C.

Gli isolati in TSA, YGC e BHI sono stati conservati a 4°C in cella frigo e trapiantati mensilmente.

3.6 ANALISI GENOTIPICA PROCARIOTI

I ceppi puri sono stati sottoposti ad analisi genotipica al fine di raggrupparli per specie ed effettuare successivamente il sequenziamento del gene 16S rDNA per la loro identificazione.

3.6.1 ESTRAZIONE DNA BATTERICO

Il protocollo usato è il seguente:

- Centrifugare a 5000 giri per 10 minuti 300 µl di brodocoltura fresca (overnight).
- Sospendere il precipitato in 400 µl di tampone di lisi TE 1X (Tris Hcl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM) e aggiungere 4 µl di lisozima (50 mg/ml). Incubare a bagnomaria a 37°C per 30 minuti.

- Aggiungere 10 µl di proteinasi k (20 mg/ml) e 12,5 µl di SDS (20% v/v) sciolto in acqua, porre ad incubare la miscela a bagnomaria a 37°C per 30 minuti.
- Procedere quindi all'aggiunta di 400µl di fenolo e successivamente centrifugare a 14000 giri per 15 minuti.
- Sottoporre il surnatante così ottenuto ad un eguale volume (400 µl) di cloroformio-alcool isoamilico (24:1) e centrifugare a 15000 giri per 10 minuti.
- A questo punto trasferire il surnatante e aggiungere 40µl di acetato di sodio (3M, pH 5,2) e 800µl di etanolo al 95% v/v freddo (-20°C) e centrifugare a 15000 giri per 30 minuti.
- Infine risospendere il precipitato contenente il DNA con 300 µl di etanolo al 70% v/v freddo (-20°C) e centrifugare nuovamente a 15000 giri per 10 minuti.
- Una volta rimosso delicatamente l'etanolo, farne evaporare le tracce rimanenti in thermomixer a 45°C, 400 rpm per 15-20 minuti.
- Aggiungere 50 µl di tampone TE1X e lasciar riposare una notte in frigo.

3.6.2 AMPLIFICAZIONE RAPD-PCR

La tecnica RAPD-PCR (Random Amplification Polymorphic DNA) è una amplificazione basata sulla reazione a catena della polimerasi che coinvolge tutto il cromosoma batterico ed utilizza un *primer* aspecifico.

In questo studio è stato impiegato il primer M13: composto da poche basi e quindi caratterizzato da una bassa specificità. Esso deriva dal fago M13 di *Escherichia coli* e presenta la seguente sequenza: 5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'.

Per ogni campione da sottoporre ad amplificazione, condotta nel Termociclatore Biometra T-Gradient, è stata allestita la seguente soluzione: Acqua milli-Q: 14,9 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 4,0 µl; dNTPs 10 mM: 0,25 µl; DMSO 100%: 1,25 µl; Primer M13 100 µM: 1,0 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,10 µl; DNA: 1 µl.

Il ciclo termico impiegato per la suddetta amplificazione è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{94^{\circ}\text{C}}{1'} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{2'} \\ \dots & \dots \\ & \frac{43^{\circ}\text{C}}{40''} \end{array} \right] \times 34; \dots \frac{72^{\circ}\text{C}}{10'} \dots \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$



Figura 45: Termociclatore Biometra T-Gradient.

3.6.3 AMPLIFICAZIONE ITS-PCR

L'ITS è una tecnica molecolare di amplificazione selettiva di sequenze specifiche del DNA. Lo studio della regione ITS (Internal Transcribed Spacers), ossia la regione intergenica compresa tra il 16S rDNA ed il 23S rDNA, ha consentito di ridurre ancor più il numero dei gruppi.

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione avente un volume finale di 25 µl: Acqua milli-Q: 18,2 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 1,0 µl; dNTPs 10 mM: 2,0 µl; DMSO 100%: 1,25 µl; Primer (f+r) 100 µM: 1,0+1,0 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,10 µl; DNA: 1 µl.

Il ciclo termico impiegato per la suddetta amplificazione è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{92^{\circ}\text{C}}{1'} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{1'} \\ & \ddots \\ & \frac{54^{\circ}\text{C}}{1'} \end{array} \right] \times 34; \frac{72^{\circ}\text{C}}{7'}; \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

3.6.4 AMPLIFICAZIONE 16S rDNA

Per effettuare il sequenziamento dei ceppi è stata effettuata l'amplificazione della regione 16S rDNA.

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione avente un volume finale di 25 µl: Acqua milli-Q: 17,25 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 2,5 µl; dNTPs 10 mM: 0,5 µl; Primer (f+r) 100 µM: 0,5+0,5 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,25 µl; DNA: 1 µl.

Il ciclo termico impiegato per la suddetta amplificazione è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{2'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{94^{\circ}\text{C}}{45''} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{1'} \\ \dots & \dots \\ \frac{50^{\circ}\text{C}}{45''} & \end{array} \right] \times 4; \left[\begin{array}{cc} \frac{94^{\circ}\text{C}}{45''} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{1'} \\ \dots & \dots \\ \frac{55^{\circ}\text{C}}{35''} & \end{array} \right] \times 34; \frac{72^{\circ}\text{C}}{7'}; \dots; \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

3.6.5 ELETTROFORESI DELL'AMPLIFICATO

Gli amplificati ottenuti possono essere valutati e confrontati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il gel si prepara sciogliendo una precisa quantità di agarosio in tampone TAE 1x (Tris base 40 mM, acido acetico glaciale 20 mM, EDTA 1mM; pH 8) e si aggiunge bromuro d'etidio in quantità pari a 5 µl/100 ml di TAE 1x. La concentrazione dell'agarosio nel caso di analisi RAPD-PCR è pari all'1,5% P/V, per l'ITS e il 16S è uguale al 2,5%. L'amplificato, prima di correre in cella elettroforetica GNA 200 (Pharmacia Biotech, Svezia), è addizionato di loading dye (blu di bromofenolo 0,025g, glicerolo 5 ml, acqua distillata 5 ml) in rapporto 9:1. Per ogni corsa vengono caricati anche 2 µl di marker, costituito da una miscela di frammenti di DNA a peso molecolare noto: per la RAPD M13 e il 16S il marker 1kb (Fermentas), mentre per l'ITS il marker 100bp (Fermentas). Il primo, a differenza del 100bp, non ha il loading dye per cui va addizionato. Il gel è stato quindi fatto correre per un tempo di 1h e 30 minuti a 110.

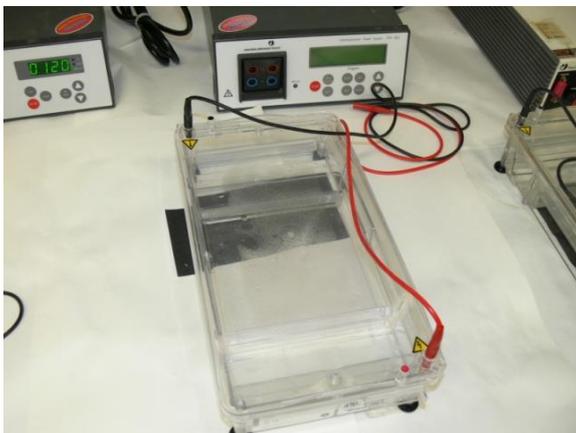


Figura 46: Box elettroforesi.

Figura 47: Cappa a flusso laminare.

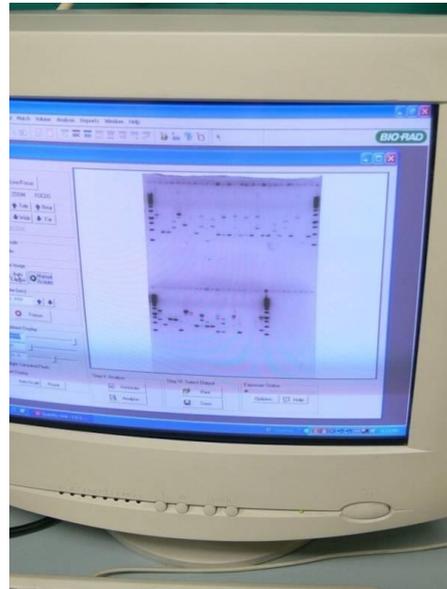


Terminata la corsa è stato sottoposto a transilluminazione UV (GEL DOC XR System, Bio-Rad Laboratories, California) e l'immagine ottenuta è stata analizzata mediante software collegato Quantity One.



Figura 49: Software per visualizzare i gel elettroforetici.

Figura 48: Transilluminatore UV.



3.6.6 SEQUENZIAMENTO ED ELABORAZIONE TRACCIATO

Il sequenziamento degli amplificati è stato realizzato presso i laboratori della ditta PRIMM di Milano.

La sequenza riscontrata per ogni ceppo è stata elaborata con CHROMAS 2.13 (Technelysium Pty Ltd. Australia): i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.7 ANALISI AMBIENTALI

Sono stati eseguiti anche controlli a livello ambientale. Le analisi hanno riguardato la valutazione microbiologica dell'aria e delle superfici di lavoro.

CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELL'ARIA

La tecnica per effettuare il monitoraggio microbiologico ambientale prevede il campionamento delle cellule microbiche sospese nell'aria e la loro moltiplicazione su idonei terreni di coltura in modo tale da poter contare e, dopo isolamento, identificare i microrganismi presenti. I metodi che prevedono la conta batterica su terreno sono in grado di rilevare però solo la frazione microbica metabolicamente attiva ovvero quella capace di riprodursi e di formare colonie

visibili. È importante ricordare, ai fini della valutazione del rischio biologico, che la dispersione dei microrganismi nell'aria e le tecniche di campionamento, possono indurre nei microrganismi condizioni di stress, riducendo così la loro vitalità e la capacità di riprodursi su un terreno di coltura e comportando, quindi, una possibile sottostima della contaminazione ambientale.

Il monitoraggio dei locali di lavorazione è stato effettuato con un sistema di campionamento attivo che prevede l'aspirazione di grandi volumi d'aria confinata per minimizzare così le differenze di distribuzione dei microrganismi dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati aerodispersi.

Per i rilievi è stato utilizzato il Microbial Air Monitoring System (Merck, mod. MAS-100 Eco®), un campionatore ad aspirazione monostadio ad impatto ortogonale, in grado di aspirare volumi prestabiliti di aria da un minimo di 10 litri ad un massimo di 500 litri.

All'interno della testa dell'aspiratore è alloggiata una piastra Petri del diametro di 90 mm contenente un terreno colturale specifico per il gruppo o microrganismo che si vuole ricercare su cui va ad impattare l'aria aspirata. Il terreno colturale viene scelto in funzione del gruppo microbico da ricercare. Le piastre vengono messe ad incubare in termostato per tempi e temperature variabili a seconda del gruppo microbico ricercato.

I campioni d'aria sono stati prelevati nei reparti di lavorazione dove il prodotto è maggiormente esposto alla contaminazione ambientale.

All'interno di uno stesso locale sono stati campionati più punti, posizionando lo strumento a diverse altezze. I rilievi sono stati ripetuti più volte (almeno 3 volte) per ottenere dati significativi ai fini del controllo della contaminazione dell'aria.

I campionamenti sono stati effettuati in due diverse condizioni:

- senza lavorazione in corso e ad ambiente pulito e sanificato;
- con lavorazione in corso.

In tale modo è stato possibile quantificare l'apporto inquinante dovuto all'attività lavorativa e alle persone presenti.

Per valutare la qualità dell'aria il D.Lgs. 626/94, pur evidenziando la necessità di monitorare la presenza di potenziali specie patogene, non fornisce valori di carica batterica o micetica a cui rapportarsi. Occorre quindi fare riferimento ad alcuni parametri indicati in letteratura: ad esempio, la Commissione delle Comunità Europee (European Collaborative Action) propone per gli ambienti indoor fasce orientative di contaminazione dell'aria il cui superamento, però, non implica automaticamente l'instaurarsi di condizioni di pericolo o insalubrità (Tabella 16a e 16b).

| LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DELL'ARIA | |
|--|--------------------------------|
| <i>Molto bassi</i> | < 50 ufc/m ³ |
| <i>Bassi</i> | 50 < ufc/m ³ < 100 |
| <i>Medi</i> | 100 < ufc/m ³ < 500 |
| <i>Alti</i> | > 500 ufc/m ³ |

Tabella 16a: Livelli di contaminazione dell'aria.

| LIVELLO DI CONTAMINAZIONE DELLE SUPERFICI | |
|--|---|
| <i>Corretta sanificazione</i> | < 50 ufc/cm ² per CBT |
| <i>Rischi per la sicurezza alimentare</i> | < 50 ufc/cm ² per coliformi |
| | < 10 ⁴ ufc/cm ² per CBT |

Tabella 16b: Livelli di contaminazione delle superfici.

CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE SUPERFICI

Per il controllo qualitativo della contaminazione delle superfici di lavoro sono state utilizzate due tecniche che prevedono lo sviluppo in piastra di microrganismi vitali: le spugnature e i tamponi. Il metodo delle spugnature prevede l'uso di spugne (4x8 cm) poste in sacchetti sterili richiudibili, contenenti 100 ml di diluente sterile (sale triptone). Al momento del campionamento, la spugna viene estratta con guanti sterili monouso, strizzata e sfregata da ambo i lati sulla superficie (solitamente 10x10 cm) da analizzare. Terminata tale operazione la spugna viene reintrodotta nel sacchetto che viene richiuso avendo cura di far uscire l'aria. Il campione tal quale viene conservato in condizioni refrigerate fino al momento dell'analisi da eseguire entro 24 ore dal prelievo. In laboratorio vengono allestite le diluizioni decimali seriali, utilizzando come diluente sempre sale triptone. Successivamente le diluizioni vengono seminate per diffusione in diversi terreni colturali e le piastre poste ad incubare per tempi e temperature variabili a seconda dell'indice microbiologico ricercato.

La determinazione delle concentrazione microbica superficiale (UFC/cm²) viene effettuata, considerando ai fini del calcolo, la diluizione seminata e l'estensione della superficie campionata, secondo la seguente relazione:

$$SdUFCcmUFC \cdot = 2/$$

dove:

UFC = numero di colonie cresciute su piastra;

d = diluizione seminata (10-x);

S = superficie campionata (cm²).

La tecnica dei tamponi viene utilizzata quando si vuole misurare il grado di contaminazione di superfici di difficile accesso con la tecnica precedente. Per questa metodica vengono utilizzati bastoncini sterili, dotati ad un'estremità di cotone idrofilo. Al momento del campionamento il tampone, dopo essere stato inumidito con sale triptone, viene sfregato contro la superficie di cui si vuole conoscere il grado di contaminazione, quindi reinserto nella provetta di sale triptone e conservato in condizioni refrigerate fino al momento dell'analisi da eseguire entro 24 ore dal prelievo. In laboratorio si procede alla semina per striscio delle piastre Petri con il contenuto tal quale delle provette contenenti i tamponi. Le piastre seminate vengono incubate a tempi e temperature variabili a seconda del gruppo microbico ricercato. Il numero di colonie cresciute costituisce il valore UFC ricercato.

I controlli delle superfici sono stati effettuati su vasche di affioramento, caldaie e tavoli spersori prima e dopo le operazioni di pulizia, soprattutto per valutare l'efficacia delle operazioni di detergenza e sanificazione.

3.8 ESTRAZIONE DNA TOTALE

L'estrazione del DNA delle specie microbiche presenti nel formaggio in toto (effettuata direttamente da tale substrato), ovvero del "DNA totale" è stata effettuata utilizzando un kit commerciale QIAamp DNASTool- Qiagen. Il protocollo estrattivo adottato è stato quello definito sul manuale delle istruzioni fornito dal produttore come "estrazione da grandi volumi di materiale".

Tale procedura è stata scelta in quanto più indicata per matrici in cui la quantità di DNA non fosse molto elevata e la sua distribuzione nel substrato poco omogenea.

I passaggi sono i seguenti:

1. Pesare 1 grammo di formaggio ed aggiungere 10 ml di Buffer ASL, passare in stomacher per 3 minuti a 230 rpm fino a quando il campione non è completamente omogenizzato.
2. Prelevare 2 ml del lisato, trasferirlo in una in una provettina da centrifuga e centrifugare a 4000 giri per 2 minuti in maniera tale da formare un *pellet* sul fondo della provetta.
3. Pipettare 1.4 ml del surnatante e trasferirli in una nuova provetta da 2 ml gettando la provetta con il precipitato.

4. Aggiungere nella provetta contenente ciascun campione una pastiglia InhibitEX. Miscelare sul vortex immediatamente e continuamente fino a completa dissoluzione della tavoletta. Incubare la soluzione a temperatura ambiente per 1 minuto per consentire l'adsorbimento delle sostanze inibitrici .
5. Centrifugare il campione a 4000 giri per 7 minuti per formare un pellet compatto e far aderire gli inibitori alla pastiglia di InhibitEX.
6. Immediatamente dopo la centrifuga prelevare tutto il supernatante, trasferirlo in una nuova provetta e centrifugarla a 4000 giri per 4 minuti.
7. Porre 25 µl di proteinasi K in una nuova provetta da micro centrifuga da 2 ml.
8. Prelevare 600 µl di supernatante del punto "6" e porli nella microprovetta contenente la proteinasi K.
9. Aggiungere 600 µl di Buffer AL e miscelare sul vortex per 15 secondi.
10. Incubare a 70 °C per 10 minuti.
11. Add 600 µl di etanolo (96–100%) al lisato e miscelare nuovamente.
12. Scrivere il nome dei campioni su nuove provette contenenti colonnine di purificazione del DNA (QIAamp spin column) e trasferirvi 600 µl del lisato del punto "11". Chiudere le provette e centrifugarle a 4000 giri per 2 minuti. Estrarre la colonnina di purificazione dalla provettina contenente il filtrato, buttare quest'ultima e porla in una nuova provettina da 2 ml.
13. Aprire la colonnina di purificazione ed applicarvi una seconda aliquota di 600 µl del lisato del punto "11". Chiudere le provette e centrifugarle a 4000 giri per 2 minuti. Estrarre la colonnina di purificazione dalla provettina contenente il filtrato, buttare quest'ultima e porla in una nuova provettina da 2 ml.
14. Ripetere il punto "13" per caricare la terza aliquota di lisato nella colonnina di purificazione.
15. Aprire la colonnina di purificazione ed applicarvi 500 µl di Bufer AW1. Chiudere e centrifugare a 4000 giri per 2 minuti. Estrarre la colonnina di purificazione dalla provettina contenente il filtrato, buttare quest'ultima e porla in una nuova provettina da 2 ml.

16. Aprire la colonnina di purificazione ed aggiungere 500 µl di Bufer AW2. Chiudere e centrifugare a 4000 giri per 4 minuti. Estrarre la colonnina di purificazione dalla provettina contenente il filtrato, buttare quest'ultima e porla in una nuova provettina da 2 ml.
17. Centrifugare nuovamente a 4000 giri per 2 minuti. Estrarre la colonnina di purificazione dalla provettina contenente il filtrato, buttare quest'ultima e porla in una nuova provettina da 2 ml.
18. Trasferire la colonnina di purificazione in una nuova provettina da centrifuga precedentemente siglata con il nome del campione corrispondente e aggiungere 200 µl Buffer AE direttamente sulla membrana della colonna. Chiudere il tappino, incubare a temperatura ambiente per un minuto e centrifugare a 4000 giri per 2 minuti per far eluire il DNA.

3.8.1 LH-PCR

Il DNA totale, estratto direttamente dalla matrice alimentare e quello estratto dai ceppi batterici isolati è stato amplificato con *primers* specifici per l'amplificazione delle regioni variabili V2 e V3 dell'operone ribosomale 16SrRNA (75) aventi dimensioni di circa 255 e 205 paia di basi (bp) rispettivamente nel gene 16S rRNA di *E. coli*. I primers utilizzati, descritti in tabella 17 erano V2F e V2R per la regione V2 e w49 e w34 per la regione V3. I primers w34, V2R, and V2F erano marcati con i composti fluorofori 5-fluoresceina-phosphoramidite: NED per w34 and V2R e l' hexachloro derivato di fluoescina (HEX) per V2F (Figura 50). Tutti i primers sono stati sintetizzati da Applied Biosystems.

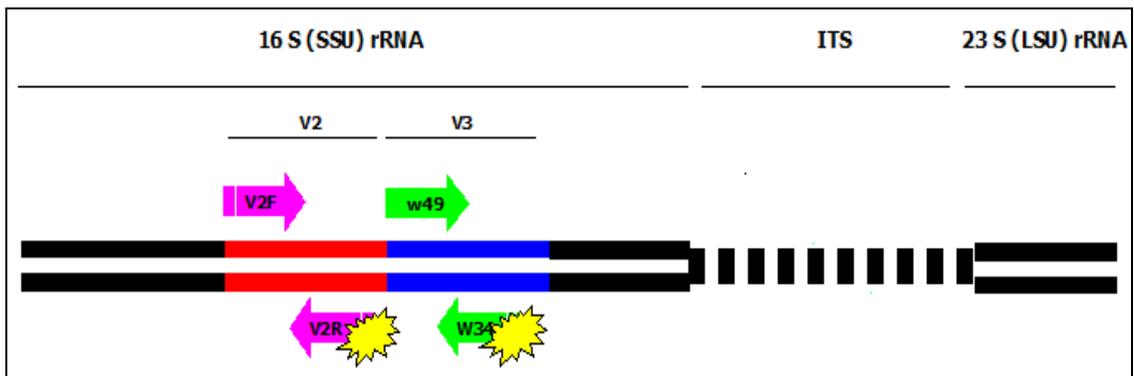


Figura 50: posizione delle regioni V2 e V3 sull'operone ribosomale 16S rDNA. Attacco dei primers e marcature con fluoro fori.

Tabella 17: primers utilizzati per l'analisi LH.

| Primer-fluoroforo | sequenza | Target |
|--------------------|---|-------------|
| V2F-HEX V2R-NED | V2F (5'-GGCGAACGGGTGAGTAA-3') V2R (5'-ACTGCTGCCTCCCGTAG-3') | V2 16S rRNA |
| w34-NED w49 | w34 (5'-TTACCGCGGCGTGCTGGCAC-3') w49 (5'-CGGTCCAGACTCCTACGGG-3') | V3 16S rRNA |

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione avente un volume finale di 25 μ l:
Acqua milli-Q: 15 μ l; dNTPs 2.5 mM 1 μ l; Primer (f+r) 10 μ M: 2,5+2,5 μ l; Buffer (Tampone Isis 10x) 2.5 μ l; Taq Isis (1U/ μ l) 0.5 μ l; DNA: 1 μ l.

Il ciclo termico impiegato per l'amplificazione della regione V2 è stato il seguente:

$$\frac{96^{\circ}\text{C}}{3'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{96^{\circ}\text{C}}{30''} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{30''} \\ \dots & \dots \\ & \frac{55^{\circ}\text{C}}{45''} \end{array} \right] \times 25; \frac{72^{\circ}\text{C}}{10'} \dots \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

Il ciclo termico impiegato per l'amplificazione della regione V3 è stato il seguente:

$$\frac{96^{\circ}\text{C}}{3'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{96^{\circ}\text{C}}{30''} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{30''} \\ \dots & \dots \\ & \frac{61^{\circ}\text{C}}{30''} \end{array} \right] \times 25; \frac{72^{\circ}\text{C}}{10'} \dots \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

Prima di essere caricati nel sequenziatore gli amplificati ottenuti sono stati valutati e confrontati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5 % caricandone 9 μ l così come descritto nel paragrafo 3.6.5. Il marker utilizzato in questo caso è stato il 100bp Fermentas (2 μ l). Il tempo di corsa è stato di 1h a 110V. In base all'intensità delle bande ottenuta sul gel l'amplificato del DNA proveniente da comunità è stato caricato tal quale in quantità pari ad 1 μ l mentre, per quanto riguarda l'amplificato ottenuto dal DNA dei ceppi puri, di questo è stato caricato 1 μ l della diluizione 1:30. La procedura di preparazione dei campioni è la seguente: per ciascun campione da caricare si mettono nelle provettine da sequenziatore 14 μ l di formamide HiDi e 0,9 μ l di marker 500bp ROX (tutto Applied Biosystems). In base al numero di campioni da caricare si prepara la miscela di caricamento e la si aliquota nelle microprovette (14,9 μ l) per ciascuna. Successivamente in ciascuna provetta si aggiunge 1 μ l di DNA amplificato con i marcatori fluorescenti tal quale o diluito. Quindi si chiudono le provette con gli appositi tappini e li si denatura nel termociclatore tenendoli per 10 minuti a 95 $^{\circ}$ C. Si apre direttamente il termociclatore e si mettono i campioni in ghiaccio lasciandoveli per almeno 5 minuti. Dopo essere stati così preparati i campioni sono stati caricati nel sequenziatore (ABI Prism 310 capillary electrophoresis) con il polimero di corsa POP-4 (tutto Applied Biosystems) che li fa

correre in condizioni denaturanti. I campioni sono stati fatti correre in triplo per 40 minuti a 15 kV. Il tempo di iniezione di ciascun campione era 5 secondi a 15 kV. I dati di fluorescenza ottenuti dopo corsa nel capillare sono stati analizzati con il programma Genescan 3.1.2 (Applied Biosystems) dove la fluorescenza minima considerata è stata di 50 Unità di fluorescenza. Mediante tale programma i dati di fluorescenza venivano convertiti in numero di paia di basi e si ottenevano dei profili elettroforetici caratteristici per ogni ceppo puro o comunità. La lunghezza in numero di paia di basi (bp) di ciascun ceppo puro è stata raccolta all'interno di un database ed è stata utilizzata come riferimento per cercare di attribuire alle specie riconosciute i singoli picchi ottenuti dai profili LH-PCR della comunità intera (latte, intermedi di produzione, formaggio). La procedura è illustrata nella figura 51.

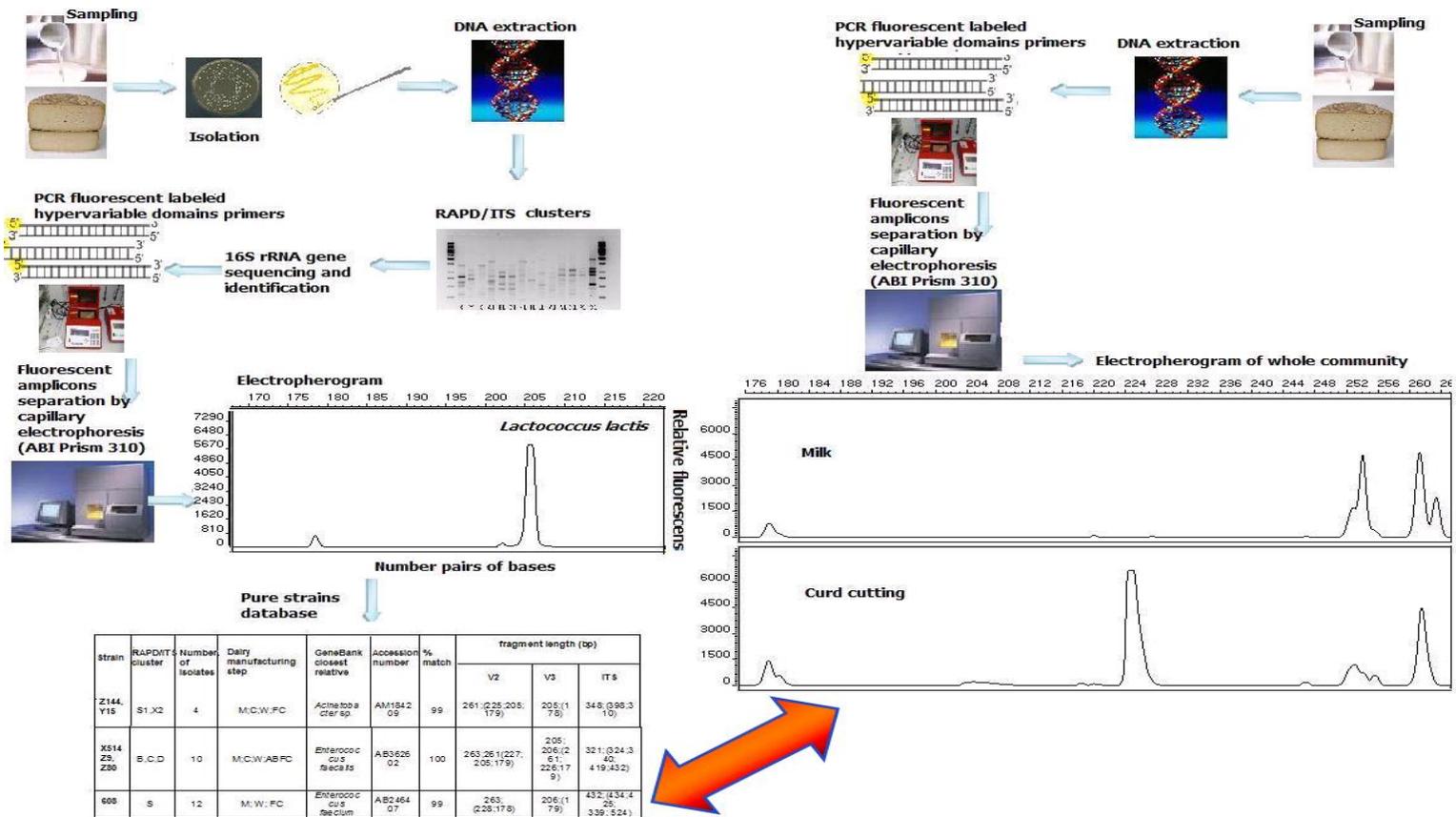


Figura 51: Procedura per la creazione dei database dei ceppi puri e per l'attribuzione dei picchi ottenuti dagli elettroferogrammi delle comunità.

3.8.2 ARISA

Il DNA totale, estratto direttamente dalla matrice alimentare e quello estratto dai ceppi batterici isolati è stato amplificato con *primers* specifici per l'amplificazione della regione spaziatrice dell'operone ribosomale compresa fra il 16S ed il 23S (figura 52). I primers utilizzati, descritti in tabella 18 erano ITSf e ITS Reub-HEX (67) quest'ultimo marcato con il fluoroforo hexachloro derivato di fluorescina (HEX). Tutti i *primers* sono stati sintetizzati da Applied Biosystems.

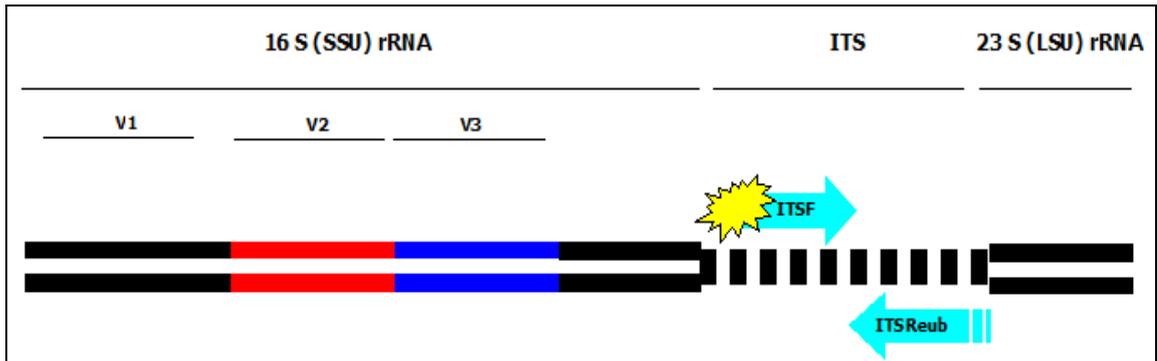


Figura 52: posizione dell'ITS sull'operone ribosomale rDNA. Attacco dei primers e marcature con fluorofori.

| Primer-fluoroforo | sequenza | Target |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| ITSf | ITSf (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') | regione spaziatrice ribosomale |
| ITS Reub-HEX | ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') | regione spaziatrice ribosomale |

Tabella 18

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione avente un volume finale di 25 µl: Acqua milli-Q:17,76 µl; Buffer 10x: 2,5 µl; MgCl₂ 25 mM: 1.25 µl; dNTPs 10 mM: 0,13 µl; Primer (f+r) 100 µM: 0,08 +0,08 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0,2 µl; DNA: 3 µl. Il ciclo termico utilizzato è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{3'}; \left[\begin{array}{ccc} \frac{94^{\circ}\text{C}}{45''} & & \frac{72^{\circ}\text{C}}{2'} \\ & \ddots & \\ & & \frac{55^{\circ}\text{C}}{1'} \end{array} \right] \times 35; \left[\begin{array}{ccc} \frac{72^{\circ}\text{C}}{10'} & & \\ & \ddots & \\ & & \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty} \end{array} \right]$$

Gli ampliconi fluorescenti sono stati caricati nel capillare elettroforetico (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) che, grazie ad apposito software, traduce la fluorescenza detectata in elettroferogrammi.

Prima di essere caricati nel sequenziatore gli amplificati ottenuti sono stati valutati e confrontati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1,5 % caricandone 9 µl così come descritto nel paragrafo 3.6.5. Il marker utilizzato in questo caso è stato il 1000 bp Fermentas (2 µl). Il tempo di corsa è stato di 1 ora e 30 minuti a 110V. In base all'intensità delle bande ottenuta sul gel

l'amplificato del DNA proveniente da comunità è stato caricato tal quale in quantità pari a 3 µl mentre, per quanto riguarda l'amplificato ottenuto dal DNA dei ceppi puri, di questo è stato caricato 1 µl di tal quale. La procedura di preparazione dei campioni è analoga a quella descritta nel paragrafo 3.10.1 eccetto che per il marker utilizzato che copre un frammento genomico più lungo: per ciascun campione da caricare si mettono nelle provettine da sequenziatore 14 µl di formamide HiDi e 0,9 µl di marker 1000bp ROX (tutto Applied Biosystems). In base al numero di campioni da caricare si prepara la miscela di caricamento e la si aliquota nelle microprovette (14,9 µl) per ciascuna. Successivamente in ciascuna provetta si aggiunge l'aliquota di DNA suddetta (3 o 1 µl) di DNA amplificato con il marcatore fluorescente. Quindi si chiudono le provette con gli appositi tappini e li si denatura nel termociclatore tenendoli per 10 minuti a 95 °C. Si apre direttamente il termociclatore e si mettono i campioni in ghiaccio lasciandoveli per almeno 5 minuti. Dopo essere stati così preparati i campioni sono stati caricati nel sequenziatore (ABI Prism 310 capillary electrophoresis) con il polimero di corsa POP-4 (tutto Applied Biosystems) che li fa correre in condizioni denaturanti. I campioni sono stati fatti correre in triplo per 45 minuti a 15 kV. Il tempo di iniezione di ciascun campione era 5 secondi a 15 kV. I dati di fluorescenza ottenuti dopo corsa nel capillare sono stati analizzati con il programma Genescan 3.1.2 (Applied Biosystems) dove la fluorescenza minima considerata è stata di 50 Unità di fluorescenza. Mediante tale programma i dati di fluorescenza venivano convertiti in numero di paia di basi e si ottenevano dei profili elettroforetici caratteristici per ogni ceppo puro o comunità. La lunghezza in numero di paia di basi (bp) di ciascun ceppo puro è stata raccolta all'interno di un database ed è stata utilizzata come riferimento per cercare di attribuire alle specie riconosciute i singoli picchi ottenuti dai profili ARISA della comunità intera (latte, intermedi di produzione, formaggio). La procedura è analoga a quella vista in LH-PCR ed è illustrata nella

figura 51 (paragrafo 3.10.1).

3.8.3 SSCP ANALYSIS

Il DNA totale, estratto direttamente dalla matrice alimentare e quello estratto dai ceppi batterici isolati è stato amplificato con *primers* specifici per l'amplificazione delle regioni variabili V2 e V3 dell'operone ribosomiale 16SrRNA (75) aventi dimensioni di circa 255 e 205 paia di basi (bp) rispettivamente nel gene 16S rRNA di *E. coli*. I primers utilizzati (descritti in tabella 17) erano V2F e V2R per la regione V2 e w49 e w34 per la regione V3. La miscela di amplificazione ed i cicli termici sono del tutto uguali a quelli descritti nel paragrafo 3.10.1 per l'LH-PCR così come il controllo dell'amplificato su gel elettroforetico. Quello che è diverso nell'analisi SSCP sono le condizioni di caricamento nel sequenziatore (ABI Prism 310 capillary electrophoresis).

In base all'intensità delle bande ottenuta sul gel l'amplificato del DNA proveniente da comunità è stato caricato tal quale in quantità pari ad 1 µl mentre, per quanto riguarda l'amplificato ottenuto dal DNA dei ceppi puri, di questo è stato caricato 1 µl della diluizione 1:30. La procedura di preparazione dei campioni è la seguente: per ciascun campione da caricare si mettono nelle provette da sequenziatore 18.75 µl di formamide HiDi e 0,25 µl di marker 400bp ROX (tutto Applied Biosystems). In base al numero di campioni da caricare si prepara la miscela di caricamento e la si aliquota nelle microprovette (19 µl) per ciascuna. Successivamente in ciascuna provetta si aggiunge 1 µl di DNA amplificato con i marcatori fluorescenti tal quale o diluito. Quindi si chiudono le provette con gli appositi tappini e li si denatura nel termociclatore tenendoli per 5 minuti a 95 °C. Si apre direttamente il termociclatore e si mettono i campioni in ghiaccio lasciandoveli per almeno 5 minuti. Dopo essere stati così preparati i campioni sono stati caricati nel sequenziatore (ABI Prism 310 capillary electrophoresis) con il polimero di corsa POP Conformational Analysis Polymer (tutto Applied Biosystems) che li fa correre in condizioni non denaturanti. I campioni sono stati fatti correre in triplo per 40 minuti a 15 kV. Il tempo di iniezione di ciascun campione era 5 secondi a 15 kV. I dati di fluorescenza ottenuti dopo corsa nel capillare sono stati analizzati con il programma Genescan 3.1.2 (Applied Biosystems) dove la fluorescenza minima considerata è stata di 50 Unità di fluorescenza. Mediante tale programma i dati di fluorescenza venivano detectati in specifici in *data point* o tempi di eluizione e si ottenevano dei profili elettroforetici caratteristici per ogni ceppo puro o comunità. I *data point* di ciascun ceppo puro sono stati raccolti all'interno di un *database* e sono stati utilizzati come riferimento per cercare di attribuire alle specie riconosciute i singoli picchi ottenuti dai profili SSCP della comunità intera (latte, intermedi di produzione, formaggio).

La procedura è simile a quella illustrata nella figura 51 (paragrafo 3.10.1).

3.8.4 DGGE PCR

Il DNA totale, estratto direttamente dalla matrice alimentare è stato amplificato con *primers* specifici per l'amplificazione delle prime tre regioni variabili (V1 - V3) dell'operone ribosomiale 16S rRNA (112) aventi dimensioni di circa 500 paia di basi (bp) nel gene 16S rRNA di *E. coli* (Figura 53). I *primers* utilizzati, descritti in tabella 19, erano 63F-GC*clamp* e 518R. Al *forward* è attaccata una serie di 42 basi citosina e guanina alternate (113) che impediscono la totale denaturazione dei frammenti di DNA amplificati durante la corsa su gel di poliacrilammide. Tale accorgimento è volto ad aumentare la risoluzione fra i domini di denaturazione delle differenti specie batteriche. Tutti i *primers* sono stati sintetizzati da Primm.

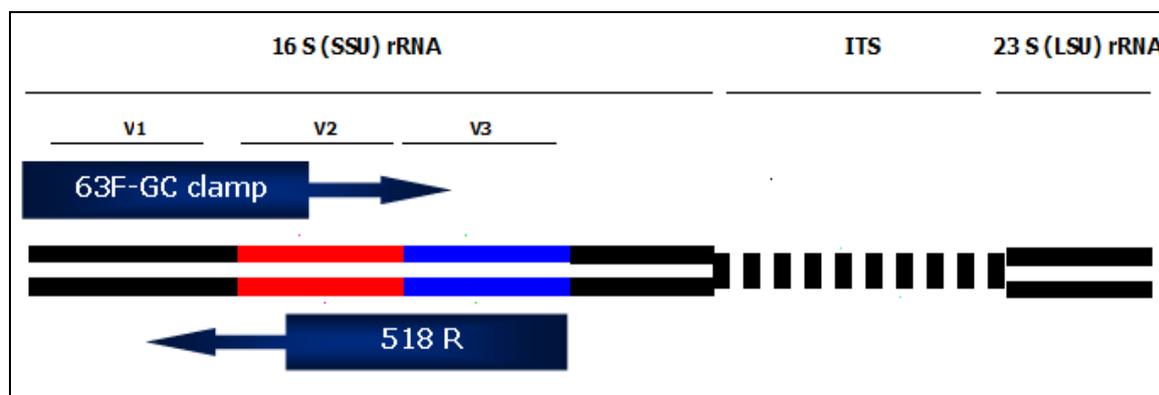


Figura 53: posizione delle regioni V1, V2 e V3 sull'operone ribosomiale 16S rDNA e attacco dei primers.

| Primers | Sequenza | Target |
|---------|--|----------------------------|
| 63 F-GC | 63F-(3' CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCC GGCCCGCCGCCCCCGCCCCCGCAGGCCTAA CACATGCAAGTC5') | regione V1 del 16S rRNA |
| 63 F | 63F-(3' CAGGCCTAACACATGCAAGTC5') | regione V1 del 16S rRNA |
| 518 R | 518R-(3' ATTACCGCGGCTGCTGG | regione V3 del 16S rRNA |

Tabella 19

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione avente un volume finale di 50µl: Acqua milli-Q: 32.2 µl; Buffer 10x: 10 µl; DMSO 5% 2.5 µl; MgCl₂ 25 mM: 3 µl; dNTPs 10 mM: 0.6 µl; Primer (f+r) 100 µM: 0.15 + 0.15 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0.4 µl; DNA: 1 µl. Il ciclo termico utilizzato è stato il seguente:

$$\frac{94^{\circ}\text{C}}{5'}; \left[\begin{array}{cc} \frac{95^{\circ}\text{C}}{1'} & \frac{72^{\circ}\text{C}}{2'} \\ & \ddots \\ & \frac{53^{\circ}\text{C}}{1'} \end{array} \right] \times 30; \frac{72^{\circ}\text{C}}{10'}; \frac{10^{\circ}\text{C}}{\infty}$$

Dopo amplificazione la presenza dell'amplificato e l'intensità delle bande ottenute è stata valutata su gel di agarosio all'1%, facendo correre i campioni per 1h e 30 minuti ed utilizzando come *marker* il 100bp (Fermentas) così come descritto nel paragrafo 3.6.5. Una quantità di

amplificato variabile da 6 a 20 microlitri è stata poi caricata su gel di poliacrilammide appositamente realizzato cui segue la corsa ed infine l'excisione delle bande da gel.

Il protocollo seguito per effettuare l'analisi DGGE è il seguente.

Allestimento del gel.

Il gel utilizzato ha una concentrazione in poliacrilammide del 7 %. Il gradiente di denaturazione utilizzato varia dal 40 al 55%.

Assemblaggio della camera per il gel (Figure 54 e 55)

- Lavare le lastre di vetro e gli spaziatori, asciugarli e pulirli con etanolo al 70%;
- Porre fra le lastre di vetro gli spaziatori di plastica e fermarli con i morsetti. Appoggiare l'assemblato nel box in cui verrà colato il gel dopo aver posto sul fondo una striscia di gomma per prevenirne la fuoriuscita dopo colatura.

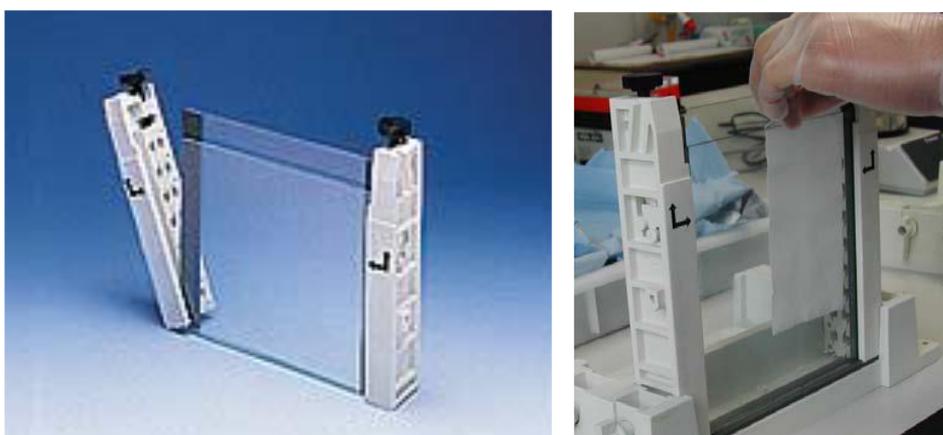


Figure 54 e 55: assemblaggio dei vetri e posizionamento degli stessi nel box.

Preparazione delle soluzioni standard di acrilamide e delle soluzioni denaturanti

Gli agenti di denaturazione sono costituiti da formammide ed urea (una soluzione denaturante al 100% corrisponde ad una soluzione 7 M di urea ed il 40% di formamide in acqua). Le soluzioni standard al 100% ed allo 0% vanno preparate in un volume finale di 100 ml, secondo la ricetta riportata in tabella 20.

Tabella 20

| | Soluzioni denaturanti (100 ml) | |
|-----------------|---------------------------------------|------|
| | 0% | 100% |
| TAE 50× (ml) | 2 | 2 |
| Acri/Bis (ml) | 17,5 | 17,5 |
| Formammide (ml) | 0 | 40 |
| Urea (g) | 0 | 42 |
| Acqua MilliQ | Portare ad un volume finale di 100 ml | |

Le soluzioni al 40 ed al 55% sono preparate in un volume finale di 12 ml, miscelando le soluzioni allo 0 ed al 100% ed aggiungendo a ciascuna APS (80 µl) e TEMED (30 µl) come riportato in tabella 21. Dopo aver aggiunto questi due ultimi componenti miscelare immediatamente.

Tabella 21: composizione delle soluzioni denaturanti al 40 e 50%.

| % denaturazione | ml soluzione denaturante 0% | ml soluzione denaturante 100% | volume |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------------|--------|
| 40% | 7.2 ml | 4.8 ml | 12 ml |
| 55% | 5.4 ml | 6.6 ml | 12 ml |

Realizzazione del gradiente e colatura del gel di poliacrilammide

Il gradiente denaturante viene realizzato mediante l'utilizzo di una pompa (Figura 56) che, tramite un sistema di vasi comunicanti, genera in modo automatizzato un gradiente denaturante continuo, miscelando opportunamente le due soluzioni (40 e 55%).

In questa fase è necessario agire in modo rapido.

- Accertarsi che la pompa sia spenta e che il canale di comunicazione per la creazione del gradiente sia chiuso.
- Introdurre la soluzione di acrilammide ad alta concentrazione denaturante (55%) nella colonnina destra e quella a bassa concentrazione denaturante (40%) nella colonnina sinistra.



Figura 56: pompa per la realizzazione del gradiente di denaturazione del gel di poliacrilammide.

- Avviare immediatamente la pompa a velocità 10 ml/min ed aprire il canale per la realizzazione del gradiente.



Figura 57: colatura del gel fra i due vetri.

- Quando il flusso della miscela di acrilammide raggiunge il fondo del vetro ridurre la velocità della pompa a 2,5 ml/min (Figura 57);
- Fermare il flusso della miscela quando il livello del liquido è approssimativamente a 0,5 cm sotto il livello del pettine che verrà aggiunto successivamente all'atto della creazione dello stacking gel.
- Versare sopra il livello del liquido circa 3 ml di acqua milliQ.
- Lasciare che il gel polimerizzi per almeno 3 ore.

Preparazione dello stacking gel

- Pulire il pettine per la realizzazione delle tasche con etanolo al 70%.
- Rimuovere l'acqua dal gel di poliacrilammide assorbendola con carta.
- Realizzare lo *stacking gel* con circa 3 ml di soluzione denaturante allo 0%, 4 μ l TEMED e 80 μ l APS.
- Introdurre il pettine.
- Lasciare polimerizzare per almeno 1 ora.

Corsa del gel

Il gel viene fatto correre a 60 V per 16 h.

Pre-corsa

Rimuovere il pettine dallo *stacking-gel* e risciacquare le taschine con acqua MilliQ utilizzando una siringa (Figure 58 e 59).

Porre il gel ed il supporto con l'elettrodo nella vaschetta contenente 7 litri di buffer di corsa 1x TAE che costituisce il box elettroforetico di corsa (D-code Universal Mutation Detection System, Biorad, California). Azionare la corrente a 70V e portare il buffer di corsa ad una temperatura di circa 60°C. (Tale operazione richiede circa 1 ora).



Figure 58 e 59: estrazione del pettine dallo stacking gel e lavaggio delle taschine.

Preparazione dei campioni

Preparare ciascun campione da caricare miscelando in ciascuna provettina 3 μ l di buffer loading-dye e da 6 a 20 μ l di DNA amplificato a seconda dell'intensità delle bande ottenute nel gel di agarosio di controllo.

Caricamento dei campioni

- Caricare i campioni tenendo il supporto con il gel di poliacrilammide sul banco di lavoro.
- Introdurre ciascun campione nella taschina con una siringa e risciacquarla con acqua MilliQ, passando da un campione all'altro (Figura 60).
- Riempire le taschine del gel lasciando vuote le prime due e le ultime due e caricare come primo ed ultimo campione lo stesso in maniera tale che funzioni da *marker* per valutare l'altezza e le posizioni reciproche delle bande sul gel.
- Porre il gel con il suo supporto nell'acquario.



Figura 60: caricamento dei campioni.

Inizio della corsa

Azionare la corrente a 90 V e lasciare correre i campioni per 16 ore.

Colorazione gel

- Dopo 16 ore spegnere il generatore di corrente ed estrarre il box con il gel dall'acquario.
- Staccare il gel dal sostegno e rimuovere delicatamente il vetro più lungo lasciando il gel appoggiato sul vetro corto. Metterlo a colorare al buio in Sybr green per 40 minuti.

Excisione bande al transilluminatore

Terminata la corsa, sottoporre il gel a transilluminazione UV (GEL DOC XR System, Bio-Rad Laboratories, California), analizzando l'immagine ottenuta mediante software collegato (Quantity One). Dopo aver effettuato una foto stamparla per le successive fasi di excisione.

- Porre il gel davanti a lampada UV, proteggendo dai raggi gli occhi con l'apposito schermo e le mani con i guanti.
- Tagliare le bande fluorescenti mediante bisturi risciacquando ogni volta il bisturi ed associando ad esse un numero sulla foto del gel.
- Porre ciascuna banda tagliata in una eppendorf siglata con il numero assegnato ad essa.
- Terminata l'excisione aggiungere in ciascuna eppendorf 50 µl di acqua milliQ sterile e lasciare riposare *over night* a 4°C dopo di che conservare in congelatore a -20°C.

Amplificazione delle bande excise e sequenziamento dell'amplificato ottenuto

Le bande excise dal gel sono state sottoposte ad ulteriore amplificazione per essere purificate con la coppia di *primers* 63F e 518R (riportati in tabella 19) identici a quelli utilizzati nell'amplificazione precedente ma privi sul *forward* della sequenza di basi ripetute GC.

Per l'amplificazione è stata utilizzata la seguente soluzione avente un volume finale di 50µl: Acqua milli-Q: da 25.5 a 21.5 µl; Buffer 10x: 10 µl; DMSO 5% 2.5 µl; MgCl₂ 25 mM: 5 µl; dNTPs 10 mM: 0.3 µl; Primer (f+r) 100 µM: 0.15 + 0.15 µl; Taq polymerase 5 U/µl: 0.4 µl; DNA: da 6 a 10 µl. Il ciclo termico utilizzato è identico a quello utilizzato con la coppia di primers 63F-GC e 518R.

Dopo amplificazione la verifica della presenza e delle corrette dimensioni (500bp) dell'amplificato è stata effettuata su gel di agarosio all'1% con *marker* 100bp Fermentas.

Il sequenziamento degli amplificati è stato realizzato presso i laboratori della ditta PRIMM di Milano.

La sequenza riscontrata per ogni ceppo è stata elaborata con CHROMAS 2.13 (Technelysium Pty Ltd. Australia): i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli presenti nella banca dati on-line (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.8.5 INDICI DI DIVERSITA' E STUDIO DI COMUNITÀ

Sui tracciati elettroforetici di ARISA e SSCP ottenuti dalle comunità di tutti e tre i caseifici (Carcoforo, Cangelo ed Alpe Mera), intendendo per "comunità" ogni singolo campione esaminato (dal latte al formaggio finito) è stato effettuato il calcolo degli indici di Shannon-Weaver:

$$H' = -\sum_{j=1}^S p_j \log_2 p_j$$

e di Equiripartizione:

$$(E = H' / \log_2 S)$$

Dove, nella prima formula, p_j , precedentemente definito come la proporzione fra la j -esima specie S_j ed il numero totale delle specie S

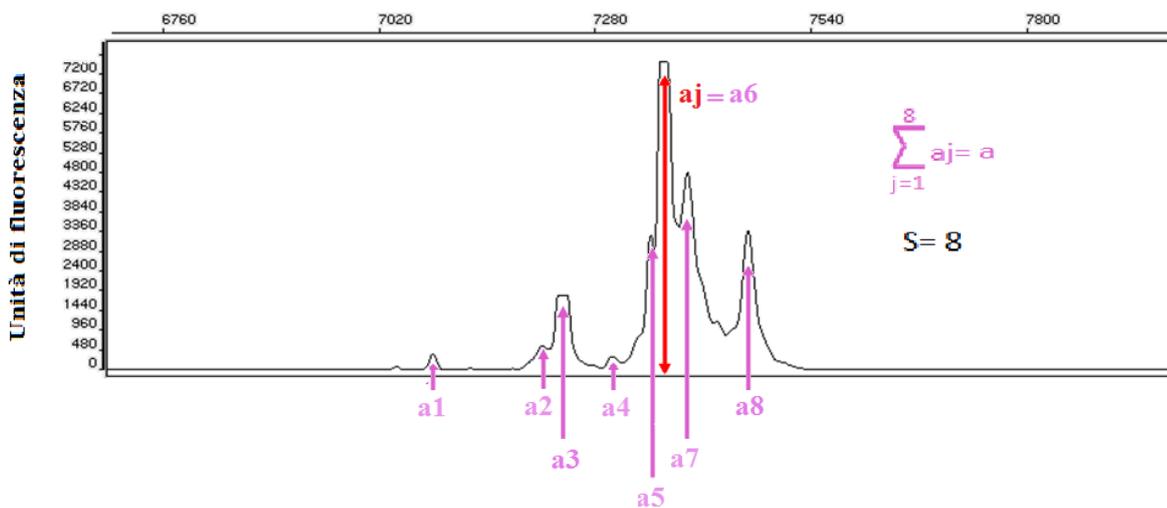
$$p_j = S_j / S,$$

è da considerarsi come il rapporto fra l'intensità di fluorescenza di ciascun picco (a_j) e l'intensità di fluorescenza totale data dalla somma di tutti i picchi (a) del tracciato elettroforetico della comunità ovvero

$$p_j = a_j / \sum a.$$

S è invece da intendersi come il numero totale dei picchi "detectati" in ciascun profilo. Tali considerazioni sono schematizzate in figura 61.

Figura 61: Profilo elettroforetico di una comunità in cui a_j è l'intensità di fluorescenza del picco j -esimo e a è la somma delle fluorescenze di tutti gli S picchi detectati.



4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CARCOFORO

4.1.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

I risultati delle analisi microbiologiche effettuate presso la realtà produttiva di Carcoforo sono riportati in Tabella 22 ed illustrati nelle Figure 62 e 63.

| Fase di lavorazione | CBT | Lattici totali | Cocchi Lattici | Enterococchi | Micrococcaceae | Lieviti |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Latte crudo | $2,5 \times 10^6$ | $6,0 \times 10^5$ | $6,0 \times 10^5$ | $3,2 \times 10^3$ | $3,6 \times 10^5$ | $5,0 \times 10^2$ |
| Dopo rottura | $1,9 \times 10^8$ | $7,1 \times 10^6$ | $2,9 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^7$ |
| Prima stufatura | $2,2 \times 10^8$ | $1,5 \times 10^7$ | $3,7 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^4$ | $1,3 \times 10^7$ |
| Dopo stufatura | $9,6 \times 10^8$ | $4,6 \times 10^8$ | $1,1 \times 10^9$ | $4,8 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^6$ | $1,4 \times 10^7$ |
| Prima salamoia | $1,8 \times 10^8$ | $3,1 \times 10^8$ | $3,0 \times 10^8$ | $1,5 \times 10^7$ | $8,1 \times 10^7$ | $1,6 \times 10^8$ |
| Dopo salamoia | $6,0 \times 10^8$ | $4,0 \times 10^8$ | $8,2 \times 10^8$ | $3,5 \times 10^6$ | $8,0 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^6$ |
| Fine stagionatura | $1,1 \times 10^9$ | $2,4 \times 10^9$ | $2,7 \times 10^9$ | $5,7 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$ | $3,0 \times 10^6$ |

Tabella 22: Carcoforo: risultati delle analisi microbiologiche. I risultati, espressi come ufc/g, sono la media di tre prelievi.

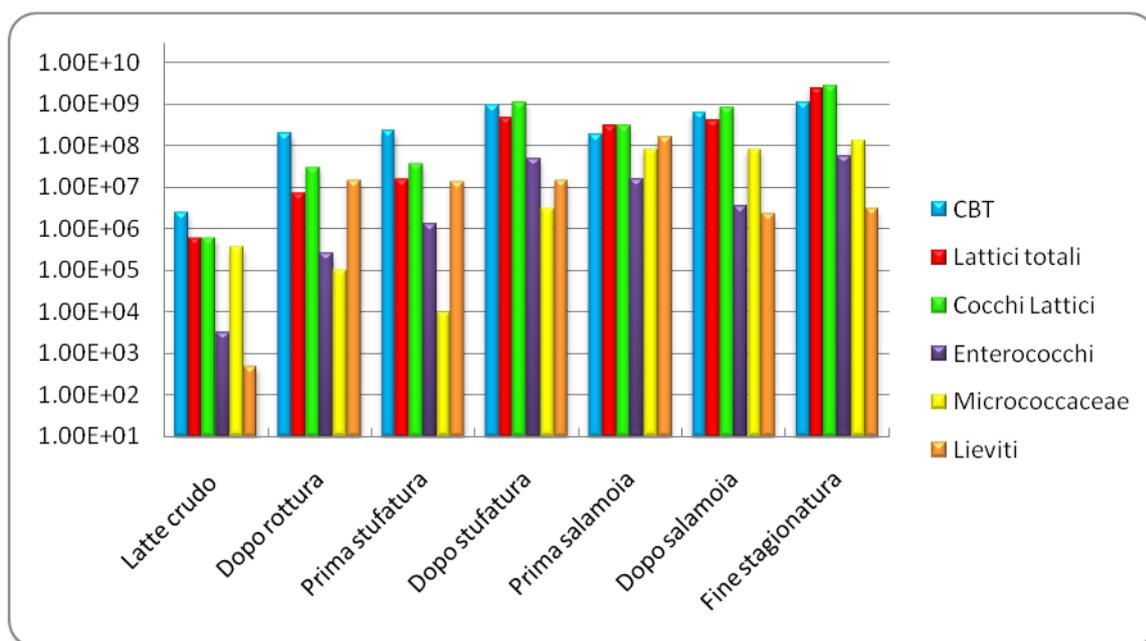


Figura 62: Carcoforo: popolazione microbica riscontrata durante la lavorazione.

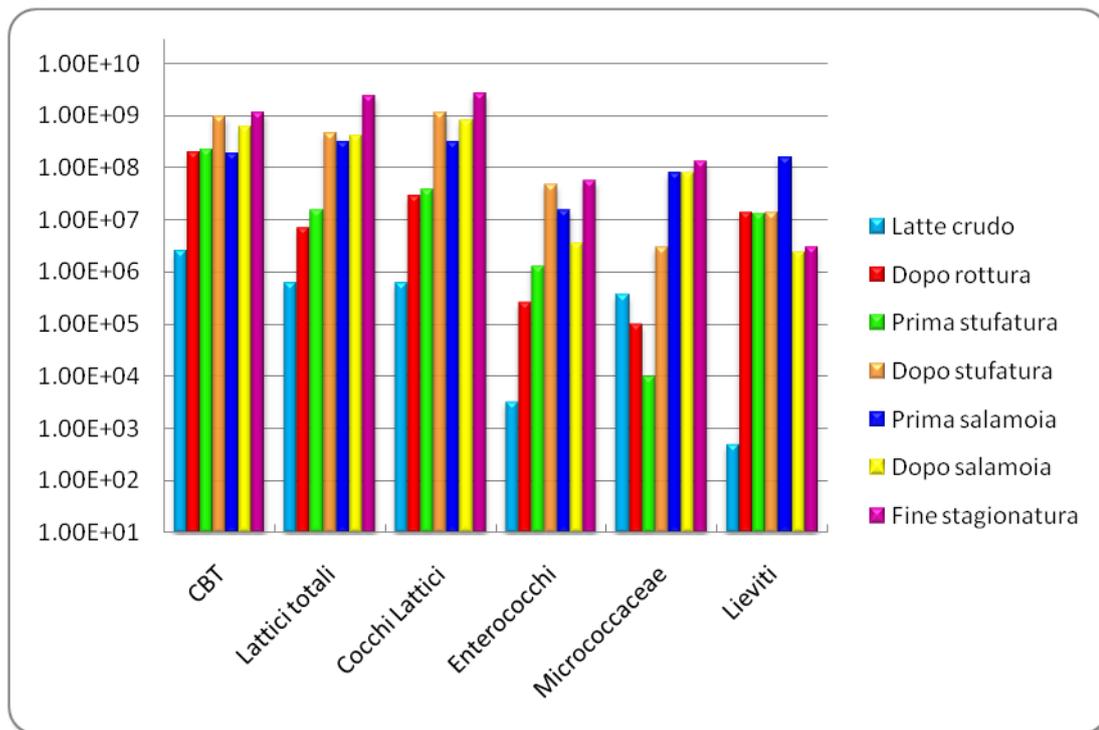


Figura 63: Carcoforo: distribuzione dei differenti gruppi microbici in funzione delle fasi di lavorazione.

Il latte di partenza è apparso di discreta qualità microbiologica. Esso infatti è una miscela di latte proveniente da due mungiture, quella serale, conservata sino al suo impiego in frigorifero, e quella mattutina impiegata nell'arco di poche ore. Pur mostrando una carica totale piuttosto alta (un ordine di grandezza superiore rispetto al riferimento di legge di 5×10^5 ufc/ml), un importante indicatore microbiologico della condizione igienica della mungitura e della caseificazione, risulta nei parametri: i coliformi totali, infatti, sono stati ritrovati in numero contenuto (200 ufc/ml) mentre sempre inferiori a 10 ufc/ml i coliformi fecali.

Piuttosto elevato è stato trovato il numero delle Micrococcaceae (10^5 ufc/ml) di cui circa la metà sono risultate essere *Staphylococcus aureus* lecitinasi positivi. Tuttavia nelle successive fasi di lavorazione non sono stati più ritrovati valori così alti. *S. aureus* è un tipico indice microbiologico di contaminazione umana (ascrivibile dunque alle fasi della caseificazione) ma, vista l'elevata quantità nel latte crudo, è probabile che derivi dall'animale stesso magari affetto da un principio di mastite subclinica difficile da diagnosticare soprattutto se a soffrirne è un singolo animale.

Durante la lavorazione grazie alla fase di riscaldamento, sosta, spurgo e all'inevitabile e spesso preziosa contaminazione ambientale è evidente un aumento generale della popolazione microbica che andrà a selezionarsi durante le fasi di stufatura e maturazione del prodotto conferendo a quest'ultimo peculiari caratteristiche sensoriali (aroma, gusto, flavour, ecc.) e reologiche (consistenza, elasticità, ecc.).

Entrando nello specifico la popolazione lattica è stata riscontrata nel latte crudo in misura di 10^6 ufc/ml ed è costituita prevalentemente da forme a cocco omofermentanti che in alcuni momenti della produzione appaiono anche leggermente superiori ai lattici totali; ciò è dovuto probabilmente alla crescita in piastra anche di forme cocciche non lattiche. La crescita dei batteri lattici è importante sino alla stufatura (da 10^6 a 10^9 ufc/ml), facilitata anche dall'abbondanza di substrato e dalla scarsa competizione di altre forme microbiche nonché dalle ideali condizioni di temperatura e umidità. Dalle conte effettuate i batteri lattici subiscono dopo la stufatura e quindi durante la salatura un arresto nella crescita a causa probabilmente dello stress dovuto alla concentrazione salina soprattutto per i batteri posti negli strati più esterni della toma caprina. Terminato infatti il periodo di salatura si osserva come durante la stagionatura la popolazione lattica ritorni a concentrazioni di oltre 10^9 ufc/ml dove presumibilmente svolge attività proteolitiche e lipolitiche sul prodotto grazie agli enzimi endogeni ed esogeni in possesso di questo gruppo di batteri (Figura 64).

Significativa è la presenza degli enterococchi che seguono un andamento molto simile ai cocchi lattici, di poco superiori a 10^3 ufc/ml nel latte, incrementano in modo continuo e regolare durante le operazioni in caldaia quindi, dopo una riduzione pari ad un ordine di grandezza, in fase stufatura e salatura riprendono la crescita durante la stagionatura per attestarsi intorno a 10^7 ufc/g nel prodotto finito (Figura 63).

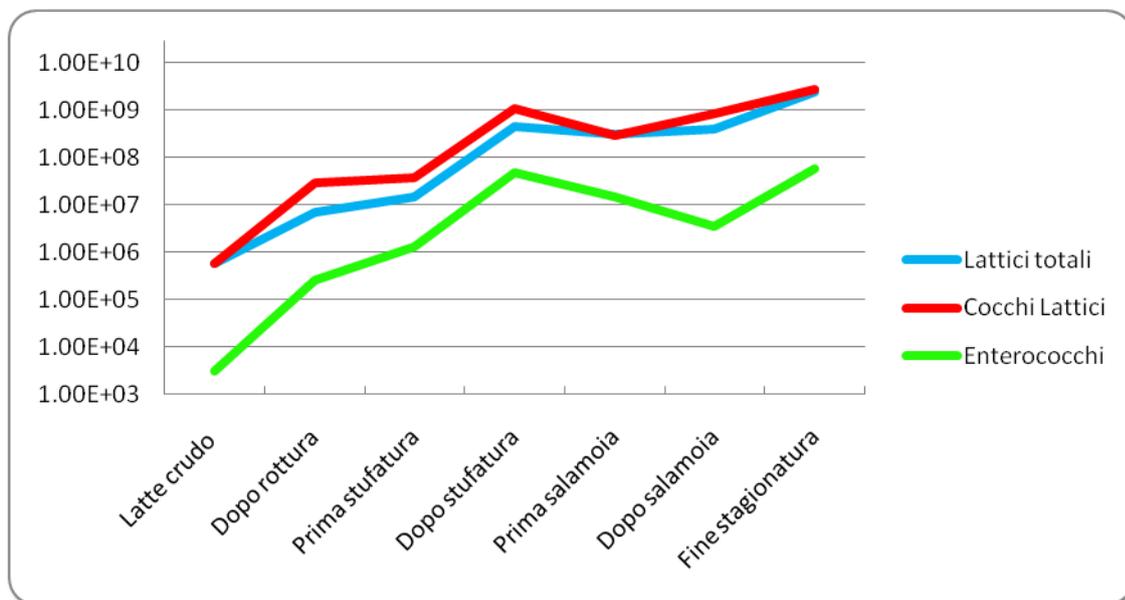


Figura 64: Carcoforo: evoluzione dei batteri lattici durante la lavorazione.

La Figura 65 riporta l'evoluzione di altri due indici microbici ricercati: Micrococcaceae e lieviti. Le Micrococcaceae, a fronte di una contrazione fino a 10^4 e poi 10^5 ufc/ml nelle primissime fasi, mostrano un progressivo aumento durante la lavorazione sino a portarsi con la salatura a valori prossimi a 10^8 ufc/g. Tale gruppo microbico risulta essere maggiormente capace di

tollerare la concentrazione salina rispetto agli altri e quindi è in grado di sfruttare al meglio la crescita esponenziale durante la stufatura che garantisce una temperatura di crescita ideale.

La fase di salatura, al contrario, determina una riduzione del contenuto di lieviti il cui numero era attestato su valori importanti fin dall'inizio della lavorazione. I lieviti molto probabilmente provengono da una contaminazione ambientale e potrebbero portare difetti al prodotto finito. Se mantenuti invece a questi livelli a fine maturazione (Figura 65) possono con la loro attività idrolitica conferire caratteristiche pregevoli al formaggio.

Durante la stagionatura compaiono le muffe provenienti dall'ambiente di lavorazione e presenti per lo più a livello della crosta. Esse svolgono un'importante attività lipolitica che concorrerà a determinare durante la stagionatura del formaggio una differenziazione tra la pasta presente negli strati appena sottostanti la crosta e la pasta presente al centro della toma che risulterà più compatta.

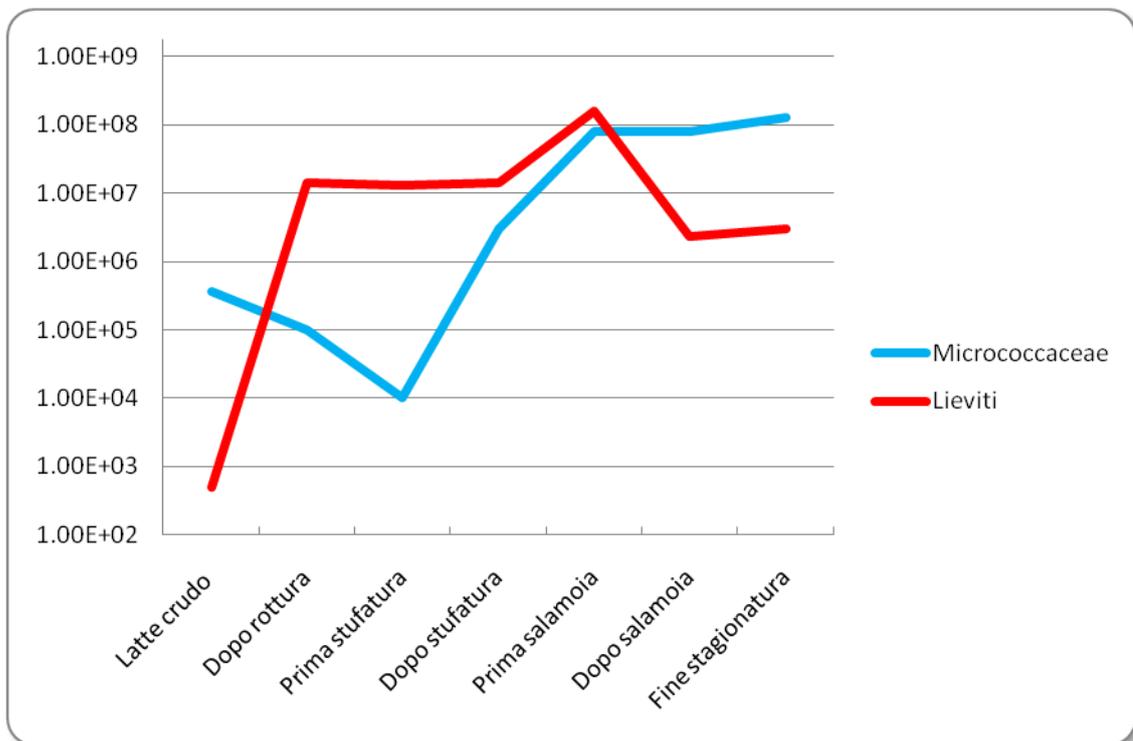


Figura 65: Carcoforo: evoluzione dei lieviti e delle Micrococceae.

La Figura 66 mette in evidenza la differenza di concentrazione microbica riscontrata nella pasta del formaggio e sulla crosta (inclusi i primissimi strati sottostanti). Come detto in precedenza risulta evidente e logica la maggior presenza di muffe, lieviti e contaminanti sulla crosta del formaggio rispetto che nella pasta dovuti ad una contaminazione dall'ambiente di maturazione attraverso l'aria, le assi di stagionatura, le mani dell'operatore, gli insetti, ecc.

Risultano invece non significative le differenze riscontrate nei Batteri lattici totali e nei cocchi lattici. Nella crosta risultano maggiormente presenti, rispetto alla pasta, batteri appartenenti alla

famiglia delle Micrococcaceae ed al genere *Enterococcus* derivanti anch'essi probabilmente da una maggior contaminazione ambientale rispetto alla pasta del formaggio.

Per quanto riguarda la ricerca dei patogeni come prescritto dal Reg. CE 2073/05 si è proceduto alla ricerca di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. La ricerca di questi due patogeni è stata effettuata sul latte crudo e sul formaggio a fine maturazione. In entrambi i casi le analisi hanno dato esito negativo e cioè assenza in 25 g di prodotto.

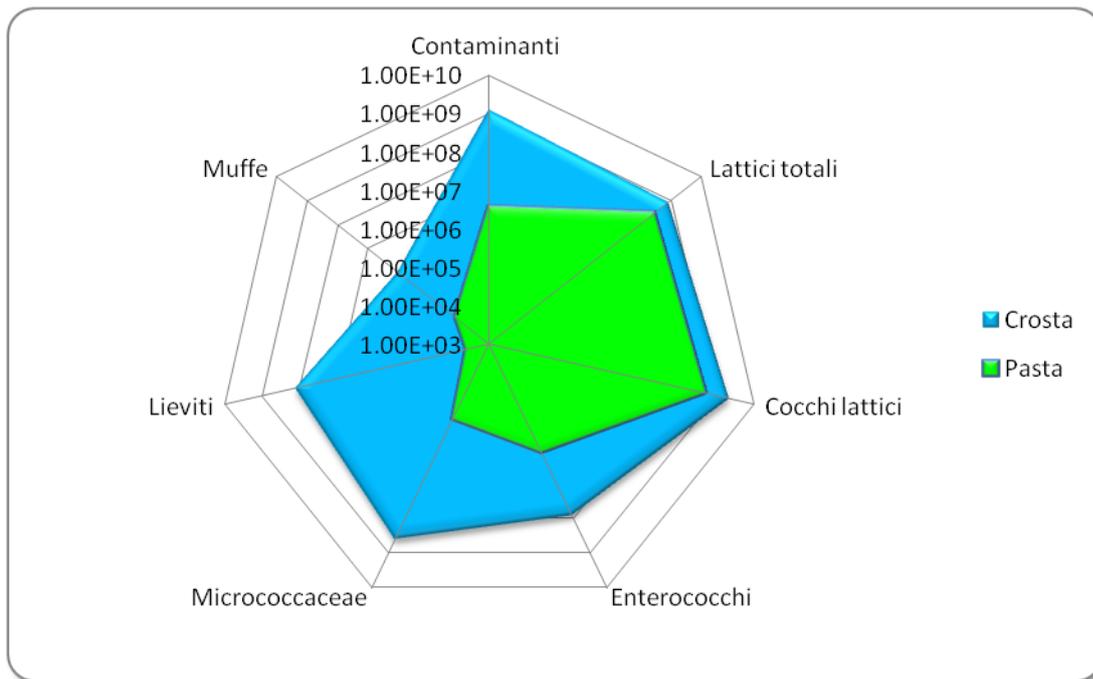


Figura 66: Distribuzione microbica tra crosta e pasta del formaggio a fine stagionatura.

4.1.2 CONDIZIONI AMBIENTALI

Condizioni igienico-sanitarie delle superfici di lavoro

Nel complesso la situazione ambientale è apparsa confortante. Tutte le superfici ed attrezzature (cestelli, caldaia, coltelli, contenitori vari, piani di lavoro) sono regolarmente lavate con detergente acido dopo ogni lavorazione.

Nel locale di trasformazione del latte, in particolare, viene effettuata una pulizia ambientale (piastrelle e pavimento) ogni 15 giorni con detergenti comuni. La carica batterica è costituita per lo più da forme lattiche derivate proprio dalla tipologia di prodotti trattati (Tabella 23).

| | CBT (ufc/cm ²) | Coliformi totali (ufc/cm ²) | Coliformi fecali (ufc/cm ²) | Lieviti (ufc/cm ²) | Muffe (ufc/cm ²) |
|----------------------------------|-------------------------------|---|--|-----------------------------------|---------------------------------|
| Tavolo di lavoro acciaio inox | 2,1x10 ² | assenti | assenti | 10 | assenti |
| Piastrella parete | - | assenti | assenti | assenti | assenti |
| Cestello plastica formatura | - | assenti | assenti | assenti | assenti |
| Caldaia pulita | 3 | assenti | assenti | <1 | <1 |

Tabella 23: Condizioni igienico sanitarie delle superfici di lavoro.

Qualità microbiologica dell'aria

Anche il controllo microbiologico dell'aria ha evidenziato una situazione confortante. Nel locale di lavorazione la carica batterica totale appare piuttosto bassa ed è comunque rappresentata da microrganismi ambientali non patogeni mentre discreta è la presenza di lieviti che si riscontrano nella normale microflora del latte lavorato soprattutto quello di origine caprina. Questa situazione è probabilmente da attribuire al ridotto numero di persone che operano nel locale ed all'attenzione prestata dall'addetta nel mantenere sempre la porta (che dà sul cortile di accesso) ben chiusa. Buona è anche la situazione del locale asciugatura, in cui i prodotti stazionano per un breve tempo prima di essere trasferiti nella cella di stagionatura (Tabella 24).

Tabella 24

| Locale | Posizione | Aria (ufc/m ³) | | |
|----------------------|---------------|----------------------------|---------------------|---------|
| | | CBT | Lieviti | Muffe |
| Lavorazione | Ingresso | 0,25 | 2,1x10 ³ | assenti |
| | Caldaia | 2,0 | 1,6x10 ³ | 43 |
| | Centro locale | 3,7 | 0,04 | 0,1 |
| Salatura/asciugatura | Centro locale | 4,5 | 0,04 | 0,2 |

4.2 CANGELLO

4.2.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

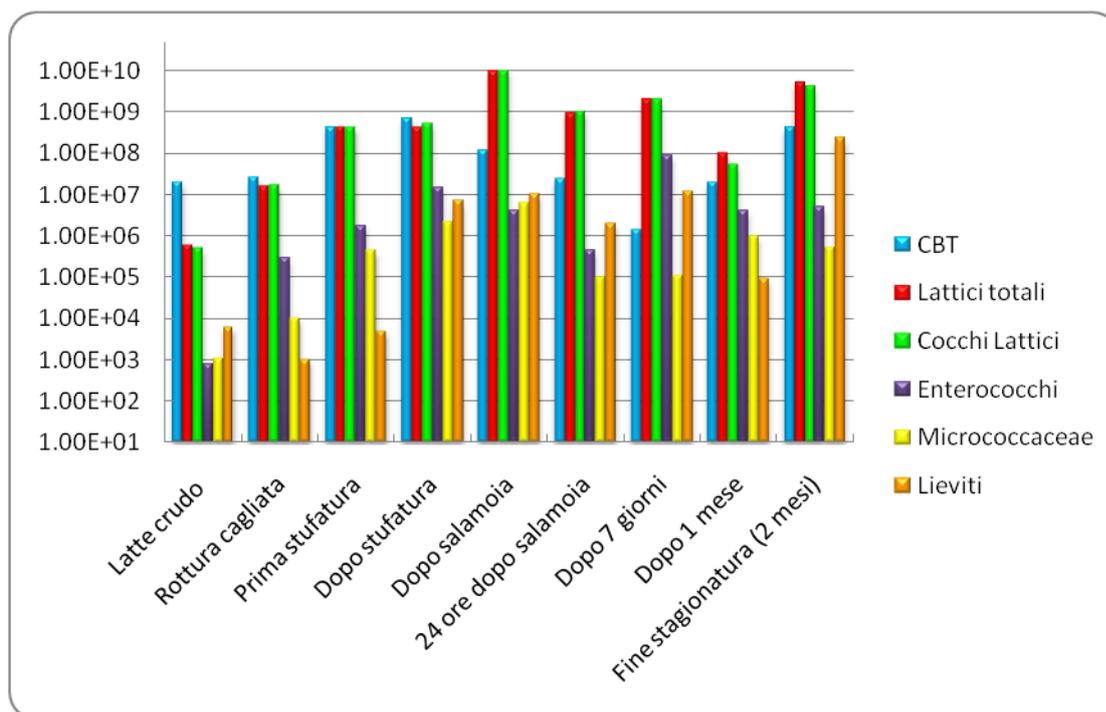
I risultati delle analisi microbiologiche effettuate sono riportati in Tabella 25 ed illustrati nelle figure 67 e 68.

| Fase di lavorazione | CBT | Lattici totali | Cocchi Lattici | Enterococchi | Micrococcaceae | Lieviti |
|----------------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| Latte crudo | $2,0 \cdot 10^7$ | $6,0 \cdot 10^5$ | $5,0 \cdot 10^5$ | $8,0 \cdot 10^2$ | $1,1 \cdot 10^3$ | $6,2 \cdot 10^3$ |
| Rottura cagliata | $2,5 \cdot 10^7$ | $1,6 \cdot 10^7$ | $1,7 \cdot 10^7$ | $3,0 \cdot 10^5$ | $1,0 \cdot 10^4$ | $1,0 \cdot 10^3$ |
| Prima stufatura | $4,3 \cdot 10^8$ | $4,2 \cdot 10^8$ | $4,2 \cdot 10^8$ | $1,7 \cdot 10^6$ | $4,4 \cdot 10^5$ | $5,0 \cdot 10^3$ |
| Dopo stufatura | $6,7 \cdot 10^8$ | $4,3 \cdot 10^8$ | $5,3 \cdot 10^8$ | $1,5 \cdot 10^7$ | $2,2 \cdot 10^6$ | $7,0 \cdot 10^6$ |
| Dopo salamoia | $1,2 \cdot 10^8$ | $1 \cdot 10^{10}$ | $1 \cdot 10^{10}$ | $4,0 \cdot 10^6$ | $6,0 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^7$ |
| 24 ore dopo salamoia | $2,4 \cdot 10^7$ | $9,4 \cdot 10^8$ | $1,0 \cdot 10^9$ | $4,4 \cdot 10^5$ | $1,0 \cdot 10^5$ | $2,0 \cdot 10^6$ |
| Dopo 7 giorni | $1,4 \cdot 10^6$ | $2,0 \cdot 10^9$ | $2,0 \cdot 10^9$ | $8,8 \cdot 10^7$ | $1,1 \cdot 10^5$ | $1,2 \cdot 10^7$ |
| Dopo 1 mese | $2,0 \cdot 10^7$ | $1,0 \cdot 10^8$ | $5,3 \cdot 10^7$ | $4,0 \cdot 10^6$ | $9,8 \cdot 10^5$ | $9,0 \cdot 10^4$ |
| Fine stagionatura (2 mesi) | $4,2 \cdot 10^8$ | $5,0 \cdot 10^9$ | $4,0 \cdot 10^9$ | $5,0 \cdot 10^6$ | $5,0 \cdot 10^5$ | $2,3 \cdot 10^8$ |

Tabella 25– Cangello: risultati delle analisi microbiologiche. Risultati, espressi come ufc/g, sono la media di tre prelievi.

E' possibile osservare che nel latte si registrano valori di carica batterica totale elevati ovvero dell'ordine di 10^7 ufc/ml tuttavia la situazione igienica è apparsa confortante: infatti il numero dei coliformi totali è risultato contenuto e sempre assenti sono risultati i coliformi fecali. Ridotta è apparsa anche la presenza di *Staphylococcus aureus* ritrovato nel latte con valori mai superiori alle 1000 ufc/ml.

Figura 67 – Cangello: popolazione microbica riscontrata durante la lavorazione.



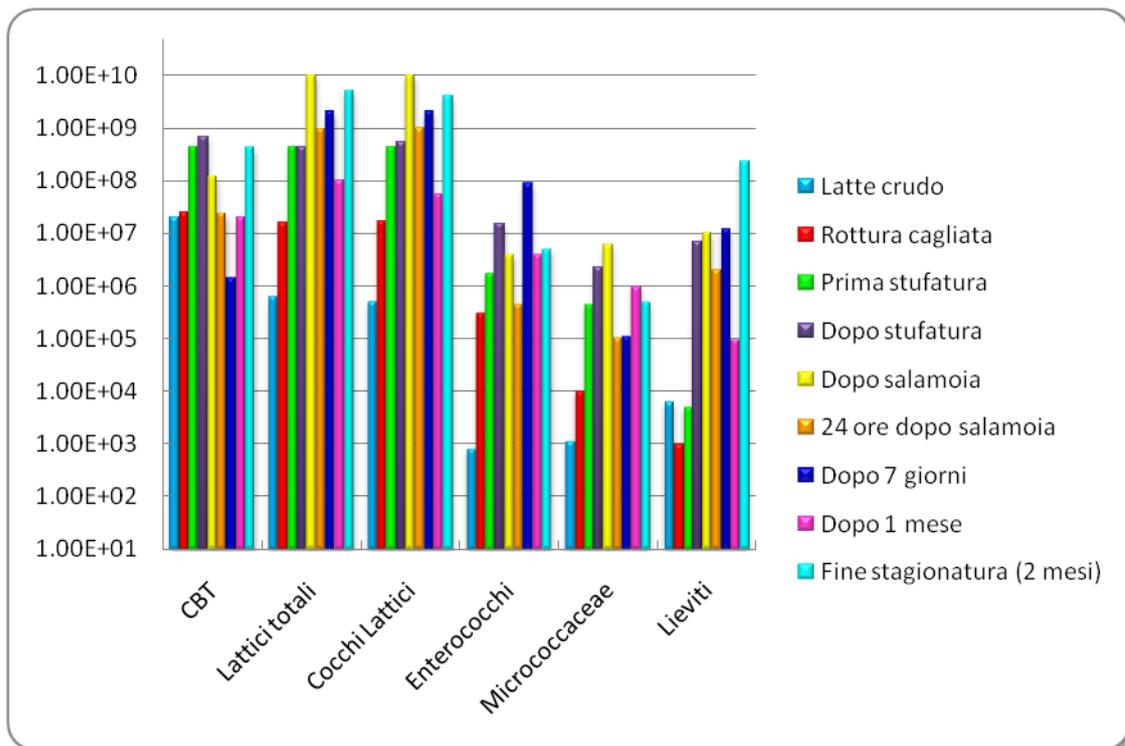


Figura 68– Cangelo: distribuzione dei differenti gruppi microbici in funzione delle fasi di lavorazione.

La Figura 69 riporta l'evoluzione nel tempo dei batteri lattici. Le forme a cocco omofermentanti rappresentano la componente lattica maggioritaria: il loro numero si sovrappone durante tutta la produzione a quello dei batteri lattici. La loro concentrazione aumenta in modo continuo dalla formazione della cagliata sino alla fase della salamoia quando si registra un picco pari a $1 \cdot 10^{10}$ ufc/g grazie alla presenza di temperature ideali per la crescita durante la stufatura; successivamente, dopo una lieve riduzione nelle prime 24 ore di stagionatura, dovuta probabilmente all'azione della salamoia stessa, si stabilizza intorno a valori di 10^9 ufc/g fino a fine stagionatura.

Gli enterococchi seguono, un andamento molto simile ai cocchi lattici benché il loro numero sia sempre di circa due ordini di grandezza inferiore (Figura 69). La loro presenza comunque contribuisce al conferimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito infatti svolgono importanti modificazioni biochimiche a carico della componente lipidica e proteica del formaggio contribuendo alla formazione di peptidi e acidi grassi a corta catena in grado di conferire gusto e aroma caratteristici.

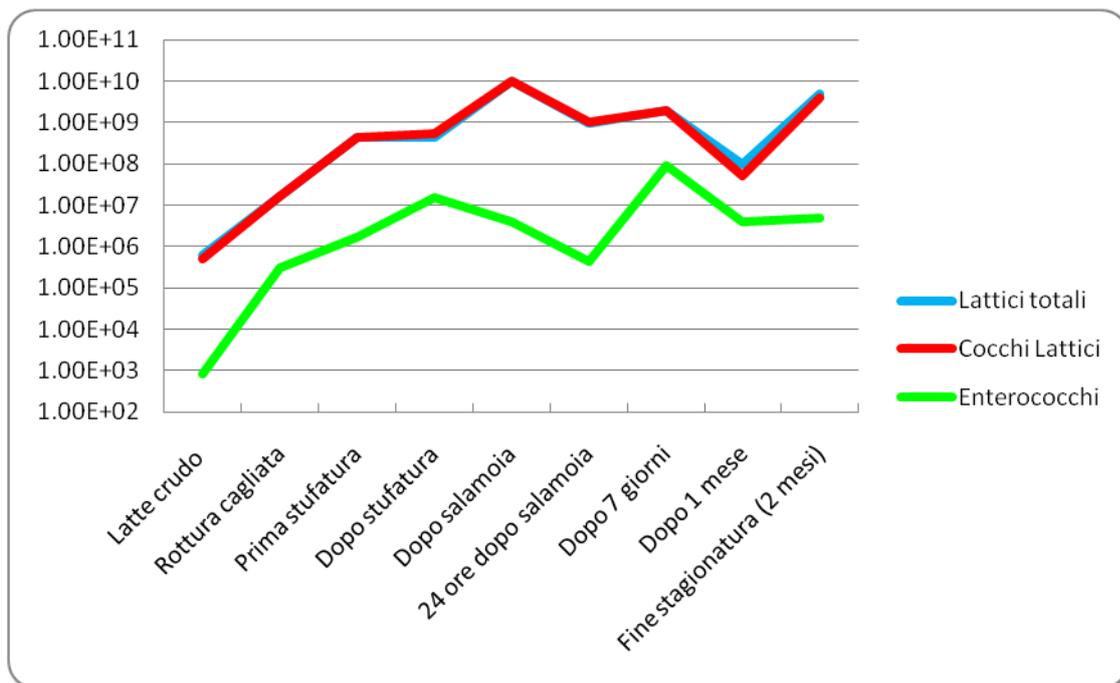


Figura 69– Canello: evoluzione dei batteri lattici.

Nella Figura 70 si può osservare come le Micrococcaceae, in numero contenuto nel latte, vadano incontro ad un progressivo aumento sino alla fase della salamoia in corrispondenza della quale si attestano su valori di 10^6 ufc/g con un incremento complessivo di 3 ordini di grandezza. Successivamente il loro numero subisce una lieve contrazione nelle prime 24 ore di stagionatura per poi assestarsi su valori dell'ordine di 10^5 ufc/g. Anche le Micrococcaceae svolgono importanti funzioni che si ripercuotono sulle caratteristiche qualitative del formaggio caprino: esse infatti prevengono l'irrancidimento dei grassi decomponendo l'acqua ossigenata prodotta da altri microrganismi e creano un ambiente riducente per riduzione dei nitrati; inoltre hanno una maggiore attività lipolitica e proteolitica rispetto ai fermenti lattici e sono in grado di metabolizzare aminoacidi e acidi grassi producendo composti importanti per il sapore e l'aroma del prodotto finito.

A fronte di una modesta presenza di muffe (Figura 71), anche a livello di crosta, si osserva una importante presenza di lieviti che presentano un andamento del tutto confrontabile a quello delle Micrococcaceae (Figura 70). La minor presenza di muffe può essere dovuta alla maggior attenzione all'igiene del locale di produzione alla minor numero di aperture verso l'ambiente esterno.

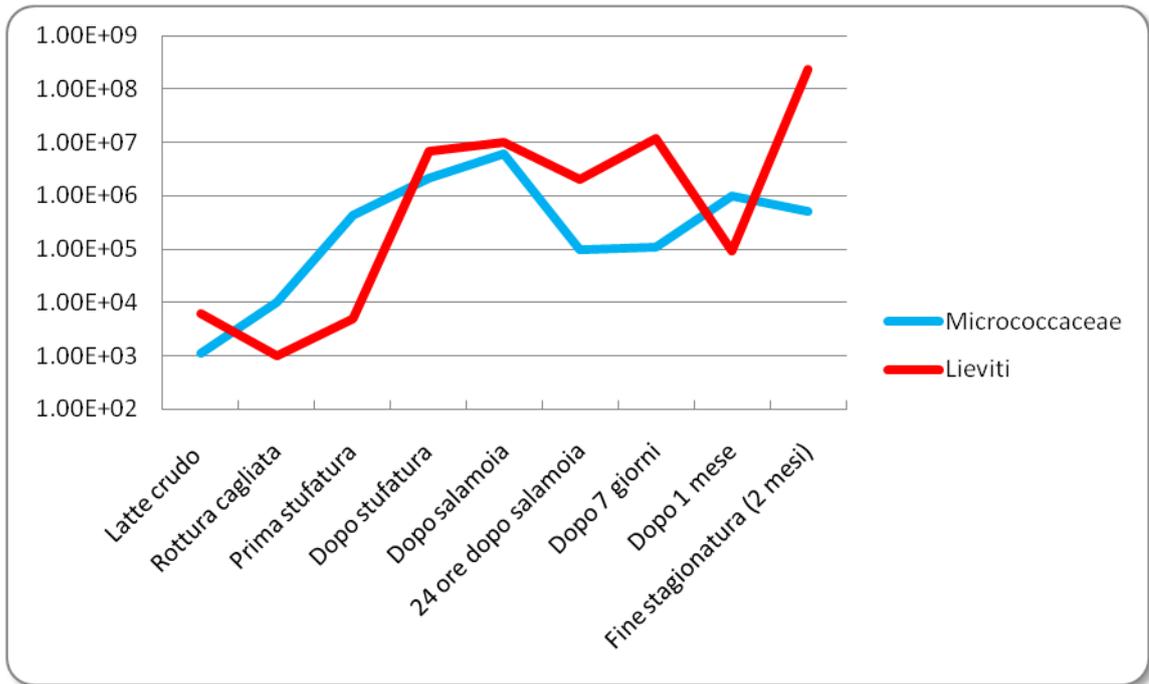


Figura70 - Canello: evoluzione delle Micrococccaceae e dei lieviti.

La Figura 71 mostra la distribuzione microbica tra la pasta e la crosta del formaggio. Anche in questo caso risulta maggiormente contaminata la crosta da parte delle muffe, i lieviti, le Micrococccaceae e gli enterococchi. La pasta è invece maggiormente ricca di Batteri lattici tra cui i cocchi lattici rappresentano la frazione preponderante.

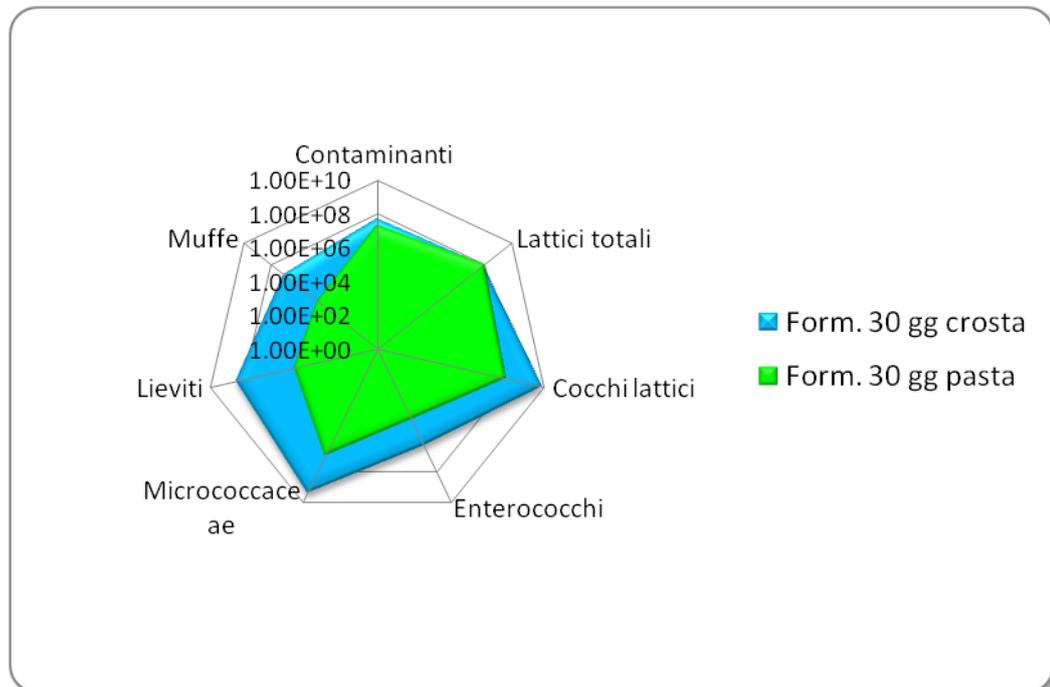


Figura 71: Distribuzione microbica tra crosta e pasta del formaggio stagionato 30 giorni.

Anche per il caseificio di Cangelo è stata effettuata la ricerca di due patogeni tipici delle matrici alimentari: la *Listeria monocytogenes* e le *Salmonelle spp.* L'analisi è stata effettuata sul latte crudo, sull'acqua della salamoia e sul formaggio dopo una settimana dalla salatura riposto quindi nel locale di stagionatura. L'indagine della *L. monocytogenes* ha dato esito negativo in tutti i campioni, è quindi assente in 25g. La ricerca delle *Salmonelle spp.* è risultata negativa (assente in 25ml) sia nel latte crudo sia nel formaggio ma è risultata presente nell'acqua della salamoia. La presenza della salmonella nell'acqua della salamoia è stato riscontrato in un unico prelievo e quindi potrebbe essere una contaminazione casuale. La nota positiva è che il patogeno non è stato rilevato nel formaggio ad inizio stagionatura e quindi la *Salmonella spp.* non è sopravvissuta alla fase di maturazione della toma a causa probabilmente della forte competizione da parte di altri batteri (lattici e non), dalla possibile presenza di batteriocine inibitrici di batteri patogeni e dalle condizioni di crescita non ideali.

4.2.2 CONDIZIONI AMBIENTALI

Qualità microbiologica dell'aria e delle superfici

I risultati sono riportati nelle tabelle 26 e 27.

| Locale | Posizione | Aria (ufc/m ³) | | |
|----------------------|-----------------|----------------------------|---------|---------|
| | | CBT | Lieviti | Muffe |
| lavorazione | Davanti caldaia | 3,0 | assenti | assenti |
| | Centro locale | 4,0 | assenti | assenti |
| | Media | 3,5 | assenti | assenti |
| salatura/asciugatura | Centro locale | 5 | assenti | assenti |

Tabella 26: Qualità microbiologica dell'aria.

La qualità microbiologica dell'aria è risultata piuttosto buona. In particolare il numero dei microrganismi per m³ di aria è apparso molto contenuto, mai superiore alle 5 ufc/m³. Ottima la situazione per quanto riguarda gli eumiceti (lieviti e muffe) sempre assenti.

Per quanto riguarda le superfici i risultati sono riportati nella tabella sottostante.

| | CBT (ufc/cm ²) | Muffe (ufc/cm ²) | Lieviti (ufc/cm ²) | RLU |
|---|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------|
| Cestello plastica prima lavaggio | 2,9x10 ² | 2,4 | 5 | 3700 |
| Cestello plastica dopo lavaggio | <10 | <10 | 2,4 | 280 |
| Parete PVC | <1 | <1 | <1 | 69 |
| Parete dietro camino (lamina metallica) | <1 | <1 | <1 | 150 |
| Asse per maturazione (esterno) | <1 | 10 | <10 | 7400 |
| Asse per maturazione (interno) | 1400 | 10 | 70 | 84000 |

Tabella 27: Qualità microbiologica delle superfici di lavoro.

La situazione, nonostante si tratti di un alpeggio, è più che confortante: le migliori strutturali apportate nel locale di lavorazione si sono rivelate efficaci (come si evince dai risultati riportati in tabella). L'utilizzo di materiale liscio, privo di asperità, facilmente lavabile ed a cui i microrganismi aderiscono con difficoltà come PVC e lamine in metallo ha semplificato al massimo le operazioni di pulizia che peraltro vengono svolte con particolare cura dei due addetti. A dimostrazione di ciò è la forte riduzione della CBT sui cestelli dopo il lavaggio.

4.3 ALPE MERA

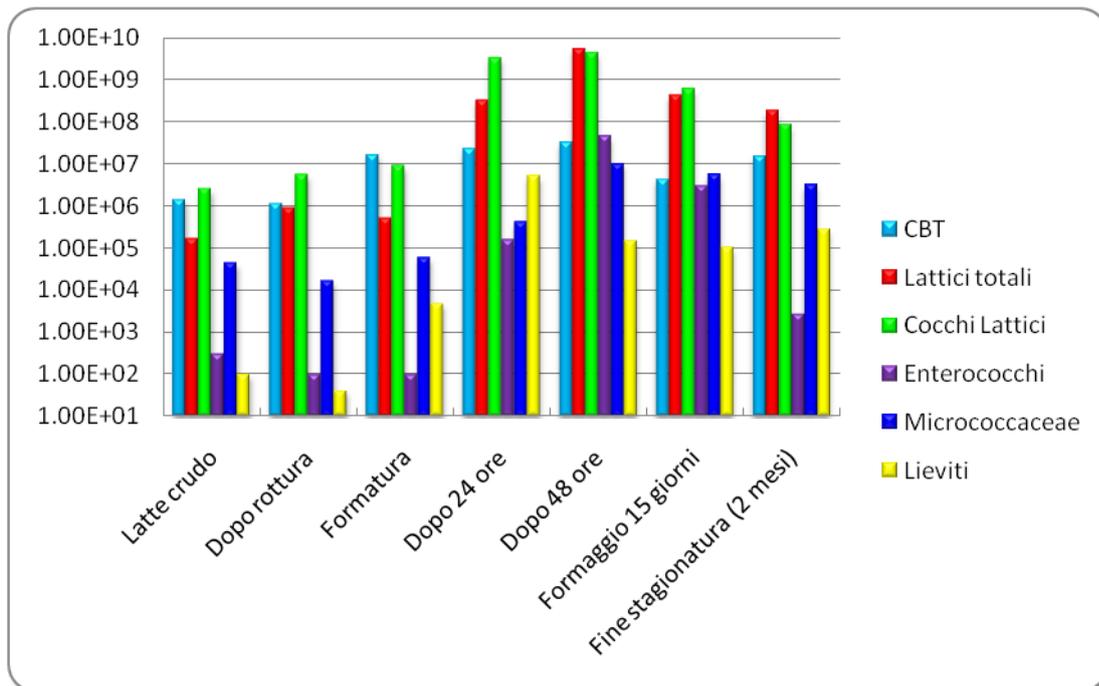
4.3.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Dalla tabella 28 e dalle figure 72 e 73 si evince la situazione microbiologica durante la lavorazione del formaggio caprino.

| Fase lavorazione | CBT | Lattici totali | Cocchi Lattici | Enterococchi | Micrococcaceae | Lieviti |
|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Latte crudo | 1,4*10 ⁶ | 1,7*10 ⁵ | 2,5*10 ⁶ | 3,0*10 ² | 4,4*10 ⁴ | 1,0*10 ² |
| Dopo rottura | 1,1*10 ⁶ | 9,0*10 ⁵ | 5,5*10 ⁶ | 1,0*10 ² | 1,6*10 ⁴ | 4,1*10 ¹ |
| Formatura | 1,6*10 ⁷ | 5,0*10 ⁵ | 8,9*10 ⁶ | 1,0*10 ² | 6,0*10 ⁴ | 4,8*10 ³ |
| Dopo 24 ore | 2,3*10 ⁷ | 3,3*10 ⁸ | 3,3*10 ⁹ | 1,5*10 ⁵ | 4,0*10 ⁵ | 5,0*10 ⁶ |
| Dopo 48 ore | 3,2*10 ⁷ | 5,5*10 ⁹ | 4,4*10 ⁹ | 4,4*10 ⁷ | 1,0*10 ⁷ | 1,4*10 ⁵ |
| Formaggio 15 giorni | 4,3*10 ⁶ | 4,2*10 ⁸ | 6,0*10 ⁸ | 3,0*10 ⁶ | 5,4*10 ⁶ | 1,0*10 ⁵ |
| Fine stagionatura (2 mesi) | 1,5*10 ⁷ | 1,8*10 ⁸ | 8,3*10 ⁷ | 2,6*10 ³ | 3,1*10 ⁶ | 2,7*10 ⁵ |

Tabella 28: Alpe Mera: risultati delle analisi microbiologiche. Risultati, espressi come ufc/g, sono la media di tre prelievi.

Il latte crudo ha una carica batterica totale pari a $1,4 \cdot 10^6$ ufc/ml ed è stata rilevata la presenza di coliformi fecali nell'ordine delle $1,3 \cdot 10^3$ ufc/ml. La presenza di coliformi fecali è da attribuire ad una possibile contaminazione durante la mungitura avvenuta probabilmente in condizioni igieniche non perfettamente idonee. Nello stesso latte è stato inoltre riscontrato in quantità pari a $4,4 \cdot 10^4$ ufc/ml anche *Staphylococcus aureus* indice di una contaminazione umana del prodotto oppure, come sottolineato per le altre realtà produttive esaminate, per problematiche derivanti dall'animale stesso. Tuttavia la presenza del patogeno (possibile produttore di enterotossine) non è stata confermata durante la lavorazione. Questo fatto avvalorava maggiormente l'ipotesi di una derivazione zoologica del batterio e non umana che si sarebbe protratta e accentuata durante le fasi di caseificazione.



Fi

gura 72: Alpe Mera: popolazione microbica riscontrata durante la lavorazione.

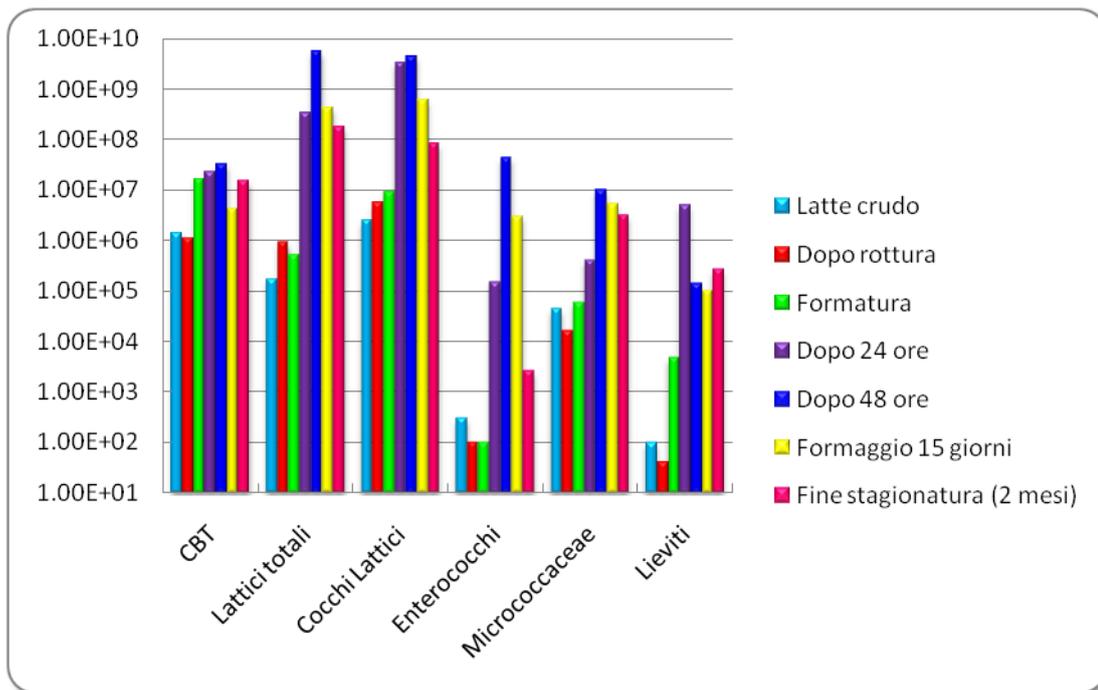


Figura 73- Alpe Mera: evoluzione dei vari gruppi microbici.

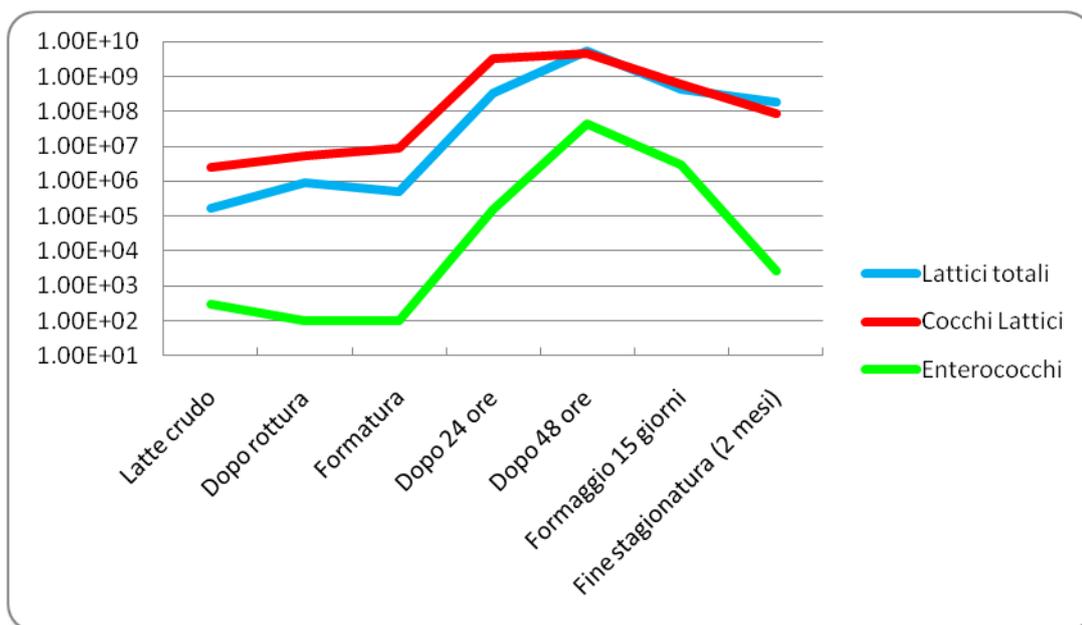


Figura 74: Alpe Mera: evoluzione dei batteri lattici e degli Enterococchi.

Come si osserva dalla Figura 74 la componente lattica è costituita anche in questo caso quasi esclusivamente da forme a cocco omofermentanti; già numericamente elevati nel latte si mantengono su valori confrontabili nelle prime fasi della lavorazione per poi subire un forte incremento dalla formatura sino all'inizio della stagionatura durante la quale si assestano intorno a valori dell'ordine di 10^9 ufc/g. I cocchi omofermentanti iniziano a decrescere durante la stagionatura che, per questo tipo di toma caprina, si protrae per oltre due mesi e causa un'inevitabile lisi di molti batteri lattici. Questi ultimi per continuare a moltiplicarsi necessitano

di condizioni ambientali e culturali molto più esigenti rispetto ai cocchi. Gli enterococchi sono presenti in concentrazione di 10^7 ufc/ml e rivestono un importante ruolo biochimico nel conferimento delle caratteristiche sensoriali del prodotto, in particolar modo su quelle olfattive ed aromatiche. La stagionatura successivamente ne provoca una significativa riduzione a valori di 10^3 ufc/ml. Il mantenimento a concentrazioni elevate degli Enterococchi sul formaggio a fine stagionatura avrebbe creato difetti qualitativi indesiderati sul prodotto oltre che un rischio igienico che non sarebbe stato possibile trascurare.

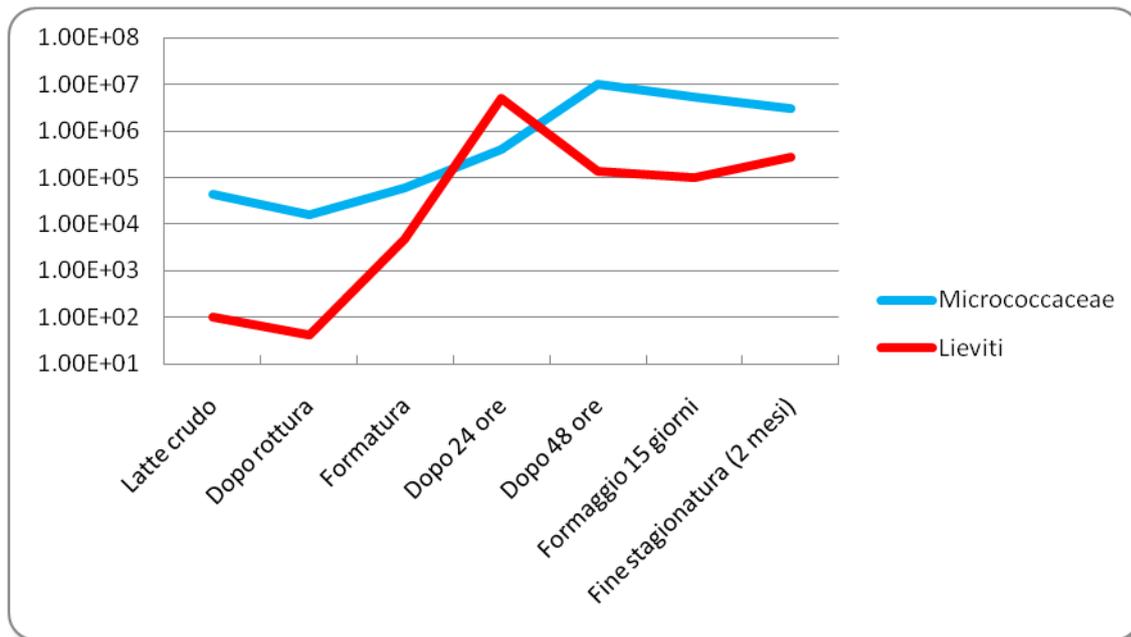


Figura 75: Alpe Mera: evoluzione dei lieviti e delle Micrococccaceae.

La Figura 75 evidenzia l'importanza dei lieviti il cui numero subisce un continuo incremento sino dall'inizio della lavorazione per raggiungere il picco massimo (10^7 ufc/ml) con l'inizio della stagionatura durante la quale il loro numero (sempre non trascurabile) si contrae ($5 \cdot 10^5$ ufc/ml). Anche in questo caso la scarsa presenza di lieviti nel latte crudo fa presupporre la loro presenza nel prodotto successivamente ad una contaminazione ambientale. Le favorevoli condizioni del substrato (presenza di lattosio, proteine e micronutrienti) ed ambientali (temperatura ed umidità) hanno permesso una rapida crescita della concentrazione di lieviti che poi, inevitabilmente, con la restrizione delle condizioni sopra descritte si sono ridotti.

Si osserva inoltre una importante presenza di Micrococccaceae che, nonostante valori numerici iniziali elevati e quindi presenti fin dall'inizio nel latte crudo, incrementano ulteriormente durante tutta la lavorazione raggiungendo valori di 10^7 ufc/ml. Come accennato anche nelle relazioni dei caseifici precedenti le Micrococccaceae hanno una maggiore attività lipolitica e proteolitica rispetto ai fermenti lattici e sono in grado di metabolizzare aminoacidi e acidi grassi

producendo composti importanti per il sapore e l'aroma oltre che conferire note cromatiche sulla crosta della toma caprina.

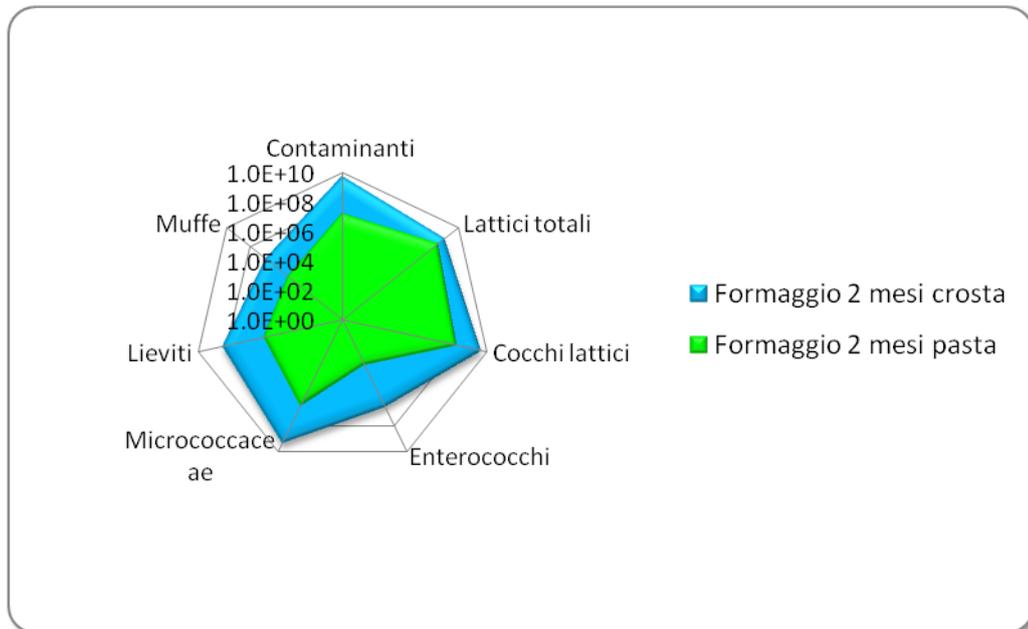


Figura 76: Distribuzione microbica tra crosta e pasta del formaggio a fine stagionatura.

Come si può osservare dal grafico in Figura 76 la crosta e gli strati appena sottostanti presentano un'elevata concentrazione e variabilità microbica con significativa prevalenza di Micrococcaceae ed Enterococchi oltre che i classici lieviti e muffe (sicuramente di derivazione ambientale) ma che svolgono sulla crosta importanti attività enzimatiche che si ripercuotono in modo preponderante sulle caratteristiche qualitative del prodotto in particolare nella maturazione degli strati sottostanti la crosta piuttosto che al centro della toma caprina.

Anche per il caseificio posto in località Mera è stata effettuata la ricerca dei patogeni quali *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* I campionamenti effettuati sul latte crudo e sul formaggio a fine stagionatura hanno dato esito negativo che dal punto di vista della legislazione comunitaria corrisponde ad una assenza in 25 grammi di prodotto.

4.3.2 CONDIZIONI AMBIENTALI

Qualità microbiologica dell'ambiente di lavoro

L'aria presenta una buona qualità microbiologica (Tabella 29): il numero di microrganismi per m³ di aria evidenziato nell'unico locale di lavorazione appare infatti molto basso. L'unico valore che supera le 10 ufc è stato ritrovato nella cella di stagionatura e, come prevedibile, limitatamente alle muffe. L'attenzione prestata dagli addetti nella chiusura delle porte e delle finestre e nel limitare il più possibile spostamenti inutili da un locale all'altro dà buoni risultati.

| Locale | Posizione | Aria (ufc/m ³) | | |
|--------------|---------------|----------------------------|-------------|------------|
| | | CBT | Lieviti | Muffe |
| lavorazione | Centro locale | 2,0 | Assenti | 0,5 |
| | Finestra | 2,7 | 0,15 | 0,5 |
| | Media | 2,4 | 0,08 | 0,5 |
| stagionatura | Centro locale | 2,2 | 0,9 | 14 |

Tabella 29: Qualità microbiologica dell'aria.

Confortante appare anche lo stato igienico delle superfici (Tabella 30). La discreta carica microbica riscontrata sui piani di legno dove vengono alloggiati le forme di formaggio trova giustificazione nel fatto che a causa dello spazio ridotto le superfici testate sono sempre utilizzate. La carica microbica è per lo più costituita da lieviti che rappresentano, almeno a livello di ambiente, la componente microbica dominante. Si tratta degli stessi lieviti ritrovati poi nel prodotto e che a seguito della porosità del materiale sono allontanati con difficoltà ma che contribuiscono a caratterizzare la qualità del formaggio durante la sua maturazione ed a conferirgli caratteristiche tipizzanti l'ambiente di lavorazione.

Tabella 30: Qualità microbiologica delle superfici di lavoro.

| | CBT ufc/cm ² | Coliformi totali | Coliformi fecali | Lieviti | Muffe |
|----------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Piastrella parete dietro caldaia | Assenti | Assenti | Assenti | Assenti | Assenti |
| Cappa aspirazione sopra caldaia | Assenti | Assenti | Assenti | Assenti | Assenti |
| Piano acciaio per sgocciolamento | 1,1x10 ³ | Assenti | Assenti | 1,1x10 ³ | Assenti |
| Griglia sgocciolamento | 1,2x10 ³ | Assenti | Assenti | 1,2x10 ³ | Assenti |
| Parete | 2 | Assenti | Assenti | Assenti | Assenti |
| Asse legno prima salamoia | 3,0x10 ⁵ | Assenti | Assenti | 2,4x10 ³ | 3,6x10 ² |
| Asse legno dopo salamoia | 1,3x10 ⁶ | Assenti | Assenti | 3,6x10 ⁴ | 2,0x10 ³ |
| Asse legno cantina | 1,0x10 ⁴ | Assenti | Assenti | 4,4x10 ² | 5,2x10 ⁴ |

4.4 CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE DEGLI ISOLATI

Le colonie cresciute sui differenti terreni colturali, dopo la conta, sono state prelevate sterilmente, purificate mediante ripetuti strisci e passaggi in brodo culturale ed infine si è proceduto all'estrazione del DNA genomico attraverso la procedura di "Mini Lisi".

I DNA estratti dagli isolati sono stati quindi sottoposti ad amplificazione RAPD-PCR e anche ad amplificazione della regione spaziatrice ITS al fine di raggrupparli in funzione del profilo elettroforetico. Sulla base dei profili elettroforetici ottenuti si sono quindi presi uno o più rappresentanti per ogni gruppo formatosi sulla base della similarità del tracciato e si è proceduto all'amplificazione della regione 16S rDNA. Dopo il parziale sequenziamento di tale regione (effettuato presso un laboratorio esterno) e confrontando la sequenza nucleotidica ottenuta con quelle presenti nei database (GeneBank) è stato possibile risalire al genere e alla specie di quei batteri che facevano parte di quel determinato gruppo o *cluster*.

In ultima analisi attraverso la codifica attribuita alle differenti colonie prelevate dalle piastre è stato possibile ricostruire il percorso del batterio a ritroso "rintracciando" il terreno colturale dal quale è stato prelevato, il caseificio di provenienza nonché la fase produttiva durante la quale è stata prelevata la matrice alimentare che lo conteneva ed infine al momento di prelievo.

4.4.1 ENTEROCOCCHI

Dalle piastre di terreno specifico per la ricerca degli enterococchi (KEA), relative all'analisi dei campioni alimentari prelevati nei tre distinti caseifici della Valsesia sono state prelevate 160 colonie. Dopo essere state strisciate più volte su terreno selettivo e osservate al microscopio per accertarne la purezza si è passati all'estrazione del DNA e alla successiva amplificazione RAPD-PCR con primer universale M13 (Figura 77) oltre che all'analisi della regione spaziatrice ITS con primers specifici (Figura 78). Questo ha reso possibile il raggruppamento dei 160 isolati in 34 cluster riportati in tabella 31.

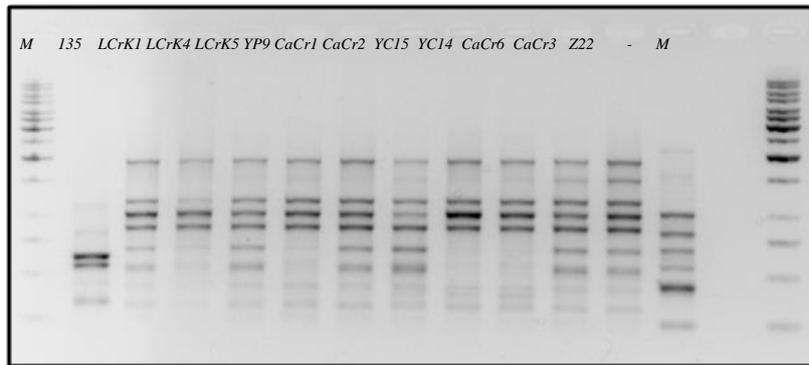


Figura 77: Esempio gel amplificazione RAPD-PCR con primer M13. Marker 100 bp.

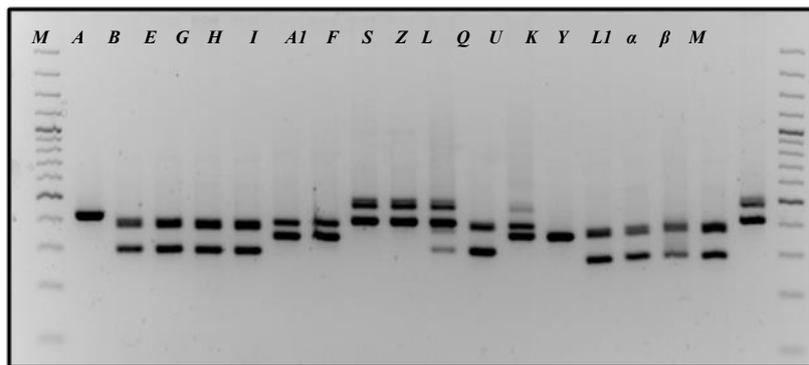


Figura 78: Gel amplificazione ITS di enterococchi. Marker 100 bp. α : *E. faecalis*. β : *E. faecium*.

| GRUPPI | CODIFICA CEPPI | | CODIFICA CEPPI | | CODIFICA CEPPI |
|----------|--|-----------|----------------|-----------|----------------------|
| A | Z46, Z43, Z51, Z42, Z48, 145, 118, 116, 117, 119, 128, 133, Z47, Z45, 129, X509, 144, 122, 121, 141, X523, 131, 120, 124, X510, 132, 134, 135, Z24, Z19, Z41 | T | 600, X511 | H1 | X522, X500, Z31, Z22 |
| B | Z52, Z17, X514 | U | CaCrK7 | I1 | Z62, Z30, Z57, Z63 |
| C | Z9, Z70, Z73 | V | LCrK4 | L1 | Z35 |
| D | Z80, Z69, Z53, Z58 | Z | Z28 | M1 | Z37 |
| E | Z6, Z10, Z3, Z13, Z8, Z16, Z12, Z72, Z65, Z11, Z79 | X | X517, Z59 | | |
| F | Z83, Z84, Z33, Z34, Z55, Z32 | W | Z36, X503 | | |
| G | Z14, Z15 | J | X508 | N1 | Z56 |
| H | X504, 127, X512, X518, X506, 125, X507, X513, 140, Z86 | Y | Z68, Z64 | O1 | Z85 |
| I | X516, 138, X519, 123, 137, X515, X502, 136, 142, X501, X505, X520, Z61 | K | Z67, Z78 | P1 | YP11 |
| L | Z21, Z20, Z77 | A1 | Z40, Z60 | Q1 | Z1, Z5, Z2, Z7 |
| M | Z76 | B1 | Z74 | | |
| N | LCrK1, LCrK5, CaCrK1, CaCrK2, CaCrK6, CaCrK3 | C1 | Z54 | | |
| O | YP9, YC15, YC14, LCrK4 | D1 | Z18, Z25, Z29 | | |
| P | LCrK6, 605, YP10, LCrK2, CaCrK4, CaCrK5, LCrK3, 609, 606, 610, 602, YC13, YP8, 601, YP12, YC11, 603, 143 | E1 | Z75 | | |
| Q | 604 | F1 | Z66, Z23 | | |
| R | 607 | G1 | Z49 | | |
| S | 608 | | | | |

Tabella 31: Ceppi presenti in ciascun gruppo di enterococchi.

Successivamente si è proceduto all'amplificazione della regione ribosomale 16S rDNA e al suo parziale sequenziamento. Dall'analisi delle sequenze in banca dati le specie ritrovate sono state: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gilvus* ed *Enterococcus gallinarum*.

Per tre gruppi (I, A1 e I1) il raffronto delle sequenze in banca dati ha dato come risultato la stessa percentuale di similarità tra due specie di enterococchi: *E. durans* ed *E. hirae*. Per questa ragione si è ricorsi ad una prova di restrizione del DNA con l'enzima *Taq1*. Come mostrato in Figura 79 tutti e tre i rappresentanti dei tre gruppi hanno dato tre bande di 100, 600 e 800 bp tipiche della specie *E. durans* (DSM2 20633^T).

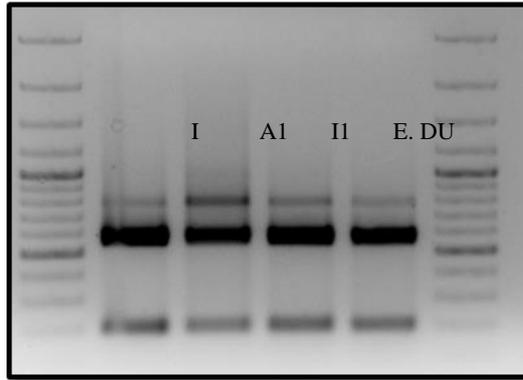


Figura 79: Corsa elettroforetica dopo restrizione del DNA genomica con enzima *TaqI*. Si osserva lo stesso tracciato del ceppo di *E. durans*.

Un'altra osservazione che è stato possibile effettuare sugli enterococchi ritrovati nei formaggi è che, come mostrato anche nella corsa elettroforetica nella Figura 77, alcuni rappresentanti dei gruppi nonostante mostrassero stesso profilo ITS e dai risultati del sequenziamento risultassero appartenenti alla stessa specie, mostravano un profilo RAPD differente. Questo probabilmente si può spiegare con l'esistenza di una biodiversità a livello di genotipo. Questa viene qui evidenziata in quanto la RAPD-PCR, a differenza dell'ITS-PCR e del parziale sequenziamento del 16S, amplifica l'intero DNA ed è quindi in grado di rilevare differenze su tutto il cromosoma batterico. E' questo il caso, per esempio, dei gruppi "B e H" che hanno uno stesso profilo ITS, entrambi sono *E. faecalis*, ma mostrano un profilo RAPD differente (vedi Figure 78 e 80).

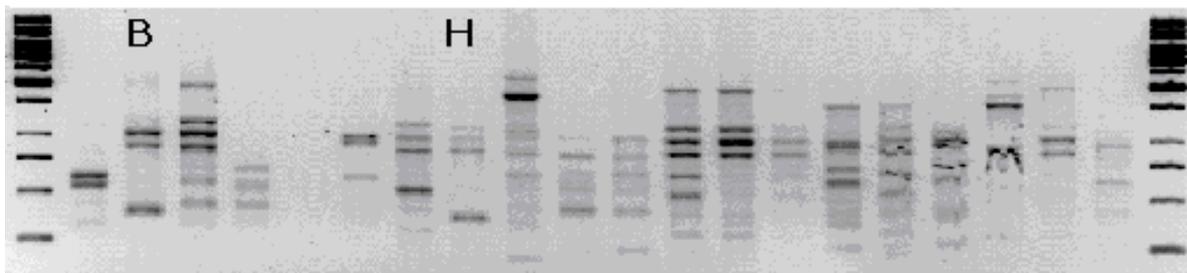


Figura 80: Gel amplificazione RAPD di alcuni esponenti dei diversi clusters dove si può notare il diverso profilo di B ed H.

Le tabelle 32-34 riportano le specie ritrovate in funzione della fase di lavorazione per ciascun caseificio.

| CARCOFORO | | |
|-------------------------------|--|--------------------|
| Provenienza | Sigla | Identificazione |
| Latte | LCrK1, LCrK2, LCrK3, LCrK4, LCrK5, LCrK6. | <i>E. faecalis</i> |
| Cagliata | CaCrK1, CaCrK2, CaCrK3, CaCrK4, CaCrK5, CaCrK6. | <i>E. faecalis</i> |
| Prima della salamoia | 605, 606, 609, 610. | <i>E. faecalis</i> |
| | 608 | <i>E. faecium</i> |
| Dopo la salamoia | 601, 602, 603. | <i>E. faecalis</i> |
| Formaggio a fine stagionatura | YP8, YP9, YP10, YP11, YP12, YC11, YC13, YC14, YC15. | <i>E. faecalis</i> |

Tabella 32: Carcoforo: risultati della caratterizzazione genomica degli enterococchi.

| CANGELLO | | |
|------------------|-------------------|--------------------|
| Provenienza | Sigla | Identificazione |
| Latte | X512, X513, X514. | <i>E. faecalis</i> |
| | X517. | <i>E. gilvus</i> |
| | X515, X516. | <i>E. durans</i> |
| Dopo stufatura | 140. | <i>E. faecalis</i> |
| | 136, 137, 138. | <i>E. durans</i> |
| Dopo la salamoia | 143. | <i>E. faecalis</i> |
| | 142. | <i>E. durans</i> |

| | | |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------|
| Formaggio 24 ore | X507. | <i>E. faecalis</i> |
| Formaggio 7 giorni | X518. | <i>E. faecalis</i> |
| | X522. | <i>E. gilvus</i> |
| | X519, X520. | <i>E. durans</i> |
| Formaggio 30 giorni | X504, X506. | <i>E. faecalis</i> |
| | X500. | <i>E. gilvus</i> |
| | X501, X502, X505. | <i>E. durans</i> |
| Formaggio fine stagionatura (2 mesi) | 125. | <i>E. faecalis</i> |
| | 123. | <i>E. durans</i> |

Tabella 33: Cannello: risultati della caratterizzazione genomica degli enterococchi.

| ALPE MERA | | |
|-----------------------|---|-------------------------|
| Provenienza | Sigla | Identificazione |
| Cagliata dopo rottura | Z40. | <i>E. durans</i> |
| Formaggio 24 ore | Z28. | <i>E. faecium RJ</i> |
| | Z31. | <i>E. gilvus</i> |
| | Z30. | <i>E. durans</i> |
| Formaggio 48 ore | Z3, Z6, Z8, Z9, Z10, Z11, Z12, Z13, Z65, Z69, Z70, Z72, Z73, Z86. | <i>E. faecalis</i> |
| | Z1, Z2, Z5, Z7, Z14, Z15. | <i>E. faecalis PFK3</i> |
| | Z74, Z76, Z77. | <i>E. gilvus</i> |
| | Z64, Z68. | <i>E. casseliflavus</i> |

| | | |
|------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| Formaggio 15 giorni | Z79, Z80, Z85. | <i>E. faecalis</i> |
| | Z32, Z33, Z34, Z83, Z84. | <i>E. faecium STP</i> |
| Formaggio 2 mesi | Z16, Z17, Z52, Z53, Z56, Z58. | <i>E. faecalis</i> |
| | Z55. | <i>E. faecium</i> |
| | Z20, Z21, Z22, Z54, Z59. | <i>E. gilvus</i> |
| | Z57, Z60, Z61, Z62, Z63. | <i>E. durans</i> |

Tabella 34: Alpe Mera: risultati della caratterizzazione genomica degli enterococchi.

Presso il caseificio di fondovalle Carcoforo sono stati identificate solo due specie di Enterococchi: *E. faecalis* ed *E. faecium*, ma mentre *E. faecalis* è stato ritrovato in tutte le fasi di produzione *E. faecium* è stato rilevato solo nello stadio precedente alla salamoia.

La realtà di Cangelo ha mostrato una variabilità maggiore: oltre ad *E. faecalis* (presente anche in questo caso lungo tutta la lavorazione) sono stati rilevati *E. gilvus* ed *E. durans*.

Infine, osservando i risultati inerenti l'alpeggio di Mera, si riscontra una variabilità ancor più pronunciata in quanto sono stati identificati sette ceppi ascrivibili a cinque diverse specie. A differenza delle precedenti produzioni *E. faecalis* non è presente in tutte le fasi lavorative e si notano invece ceppi non rinvenuti né a Cangelo né a Carcoforo come *E. faecium RJ16*, *E. faecalis PFK3*, *E. casseliflavus* e *E. faecium STP*.

4.4.2 BATTERI LATTICI

Per la ricerca dei batteri lattici presenti nel latte crudo caprino, nella cagliata in lavorazione e nel formaggio caprino a fine maturazione si sono utilizzati due terreni culturali: MRS (per la ricerca dei lattici totali) ed M17 (per la ricerca dei cocchi lattici). Sono state prelevate 121 colonie dal terreno MRS e 97 colonie dal terreno M17. La procedura di classificazione è stata la medesima seguita per gli enterococchi: estrazione del DNA, amplificazione RAPD-PCR, amplificazione ITS-PCR (Figura 81). Come mostrato nelle Tabelle 35 e 36 è stato possibile raggruppare gli isolati da MRS in 24 gruppi e quelli da M17 in 37.

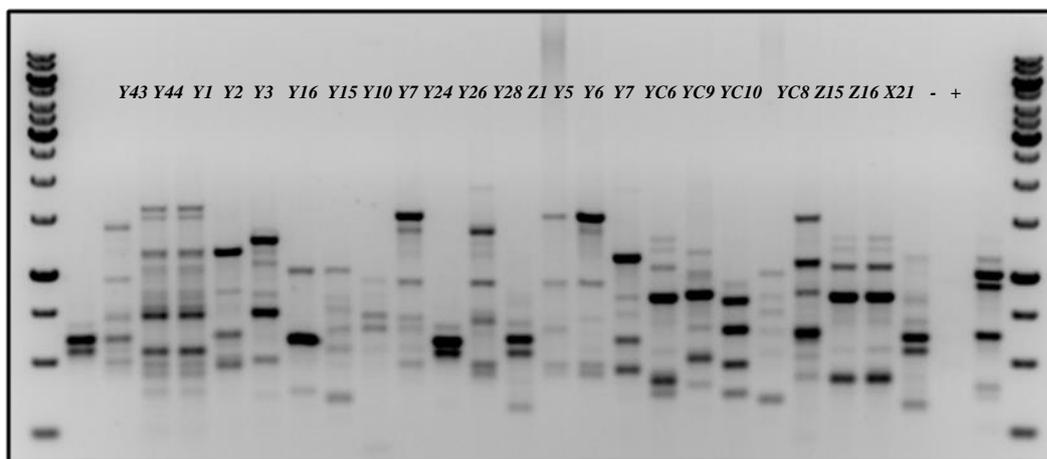


Figura 81: Esempio di amplificazione RAPD M13 di batteri lattici prelevati da M17. Marker 1Kb. Per esempio i ceppi Y1 e Y2 hanno lo stesso tracciato e verranno messi nello stesso cluster.

| | CODIFICA CEPPI | | CODIFICA CEPPI | | CODIFICA CEPPI |
|----|--|----|----------------|----|----------------|
| R1 | Z142, Z185 | H2 | X566 | A3 | YC9 |
| S1 | Z144, Z159, Z175 | L2 | X585 | B3 | YC10 |
| T1 | Z146, Z149, Z169, Z173 | M2 | X588 | C3 | Z140 |
| U1 | Z155, Z165, Z166, X596 | N2 | X594 | | |
| V1 | Z162, Z177, Z179 | O2 | X593 | | |
| Z1 | Z170, Z174, Z182, Z183 | P2 | X229 | | |
| X1 | X562, X564, X572, X575, X578, X581, X582, X228, X206, Y24, YP5, YP6, YC7 | R2 | Z156 | | |
| Y1 | X598, X223, X570, X220 | S2 | Y13 | | |
| K1 | X226, X225, X219, X227, X216, X218, X214, X217 | T2 | Y31 | | |
| W1 | X200, X207, X215, X210, X212, X201, X202, X204, X203, X209, X205, Y32, Y34, Y5, X211, Y43, Y26, Z143, X213, X568, X208 | U2 | Y44 | | |
| J1 | X220, X222 | V2 | Y3 | | |
| A2 | Y36, Y38, Y40 | Z2 | Y16 | | |
| B2 | Y1, Y2 | X2 | Y15 | | |
| C2 | Y10, YC8 | Y2 | Y7 | | |
| E2 | Z153, Z157 | K2 | Y28 | | |
| F2 | Z168 | W2 | YP7 | | |
| G2 | X560 | J2 | YC6 | | |

Tabella 35: Gruppi batteri lattici isolati dal terreno M17. Il primo ceppo per ogni gruppo è stato utilizzato per il sequenziamento

| | CODIFICA CEPPI | | CODIFICA CEPPI |
|----|---|----|---|
| D3 | Z100, X178, X198, X175 | Q3 | Y86, YP50, YP56 |
| E3 | Z96, Z91, Z92, Z134, Z133, Z132, Z89 | R3 | Z95, YC50, X550, X549, X551, YP60 |
| F3 | Z126, Z124, Z121, Y69 | S3 | X533, X538, X174, X535, X556, X531, X536, X557, X172 |
| G3 | Z106, Z103, Z102 | T3 | YC61 |
| H3 | Z90, Z97 | U3 | X555 |
| I3 | Z105, Y07 | V3 | X170 |
| L3 | Z114, Z112, Z125, X193, X194, X180, X162, X179, X544, X160, X157, X182, X166, X186, X546, X168, X158, X156, X161, X164, X176, X232, X163, X188, X152, X150, X154, X184, X189, X151, X165, X153, X155, X159, Z109, X527 | Z3 | Z116 |
| M3 | Y93, X540, Y89, Y90, Y63, Y56, Y80, Y88, Y51, Y59, X199, X181, X230, X231, X234, YC57, X187, X192, X185, X195, X196, X197, X233 | X3 | Y98 |
| N3 | X525, Y74, Z119, Z117, Z107 | W3 | Z99 |
| O3 | Y61, 607 | J3 | Y83 |
| P3 | X173, X171, X235, X169 | K3 | Z127 |
| | | Y3 | Y57 |
| | | A4 | Z130 |

Tabella 36: Gruppi batteri lattici isolati dal terreno MRS. In grassetto i ceppi utilizzati per il sequenziamento.

Successivamente preso il DNA di uno o più individui rappresentanti per ogni gruppo si è amplificato il 16S rDNA per il sequenziamento e la successiva identificazione.

Dalle codifiche è stato possibile risalire al caseificio e alla fase operativa durante la quale è stato isolato il batterio come mostrato nelle Tabelle 37, 38 e 39. E' importante osservare che, come già si era constatato nella parte relativa alle conte, nonostante i due terreni di isolamento siano differenti la microflora dominante è rappresentata da forme a cocco omofermentanti obbligate.

| CARCOFORO | | |
|-----------------------|----------------------------------|--|
| Provenienza | Sigla | Identificazione |
| Latte crudo | Y74. | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| | Y5. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | Y80. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| Cagliata | Y93, Y88, Y90, Y89, Y24, CaCrK7. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| | Y86. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | Y96. | <i>Leuconostoc lactis</i> |
| | Y10. | <i>Streptococcus parauberis</i> |
| Prima della stufatura | Y43, Y26, Y34. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | Y44, Y51, Y56, Y59, Y63. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| Fine stagionatura | YP50, YP56. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | YC57, YP7 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| | YP5. | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| | YC8. | <i>Streptococcus parauberis</i> |

Tabella 37: Risultati della caratterizzazione genomica dei batteri lattici.

Durante le fasi di lavorazione della toma caprina prodotta nel caseificio di Carcoforo sono state rilevate differenti specie di batteri lattici appartenenti al genere *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*. In particolare il *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e il *Lactococcus garviae* sono stati riscontrati in tutte le fasi dal latte crudo fino al formaggio a fine stagionatura. Inoltre si è osservata la presenza dello *Streptococcus thermophilus* e di *Streptococcus parauberis*.

CANGELLO

| Provenienza | Sigla | Identificazione |
|----------------------------------|--|---|
| Latte crudo | X152, X150, X154, X153, X156, X200, X201, X202, X203, X205, X182, X184. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X562, X564, X181, X185. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| | X525. | <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> |
| Cagliata | X158, X156, X155, X207, X204, 133, 131, 132, 134, X193, X194. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X206, X192, X195. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| Siero | X166, X164, X168, X163, X210, X208, X209, X211, X280, X179, X176. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X175, X178. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| Cagliata prima della salamoia | X162, X160, X161, X159, X215, X212, X213, 118, 117, 119, 120, X509, X510. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X198, X199, X196, X197, X533, X531, X572, X575, X219, X216, X217, X218. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| | X170. | <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> |
| Cagliata dopo la salamoia | 145, 144, 141. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X172, X223, X220, X222, 143. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. |

| | | |
|--------------------------------------|--|---|
| | | <i>cremoris</i> |
| Formaggio 7 giorni | X523, X544, X546, X568. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X570, X538, X536, X540, X578, X581. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| Formaggio 1 mese (pasta e crosta) | X550, X549, X551. | <i>Lactococcus</i> <i>paraplantarum</i> |
| | X598, X556, X537, X582. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |
| | X555. | <i>Leuconostoc lactis</i> |
| | X585. | <i>Staphylococcus lentus</i> |
| | X588, X593, X596. | <i>Staphylococcus equorum</i> |
| Formaggio a fine stagionatura | X232, 122, 124. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | X174, X230, X231, X234, X233, X228, X226, X225, X227, X229. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> |

Tabella 38: Risultati della caratterizzazione genomica dei batteri lattici.

Occasionalmente sono state rinvenute forme etero fermentanti rappresentate comunque dalla sola specie *Leuconostoc mesenteroides*. Decisamente poco incisivo è il ritrovamento anomalo di bastoncini rinvenuti solo nel caseificio di Mera nel formaggio durante la lavorazione.

Anche durante la lavorazione effettuata nel caseificio di Cangelo le specie di batteri lattici predominanti sono *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus garviae*. Nel latte crudo e nella cagliata si riscontra anche la presenza di *Leuconostoc mesenteroides* e, nella pasta del formaggio, *Leuconostoc lactis*. Inoltre è da sottolineare la presenza di *Staphylococcus lentus* e *S. equorum* soprattutto nel prodotto in maturazione ed in prevalenza sulla crosta.

| ALPE MERA | | |
|-------------|-------|--|
| Provenienza | Sigla | Identificazione |
| Latte | Z142. | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> |

| | | |
|------------------------|--|---|
| | Z51, Z125, Z143. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | Z121, Z124, Z126. | <i>Leuconostoc lactis</i> |
| Cagliata | Z43, Z42, Z109, Z112, Z114, Z177, Z179. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| Formatura | Z46, Z162. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| Formaggio 24 ore | Z149. | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> |
| | Z24. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| | Z130. | <i>Leuconostoc citreum</i> |
| | Z127. | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> |
| Formaggio 48 ore | Z89, Z90. | <i>Lactobacillus paraplantarum</i> |
| | Z182, Z183, Z169. | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> |
| | Z107. | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| | Z165, Z166. | <i>Staphylococcus equorum</i> |
| Formaggio 15 giorni | Z132, Z133, Z134. | <i>Lactobacillus paraplantarum</i> |
| | Z170, Z173, Z174. | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> |
| | Z35, Z37. | <i>Pediococcus pentosaceus</i> |
| | Z119, Z117. | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| Formaggio 2 mesi | Z91, Z92, Z95, Z96, Z97. | <i>Lactobacillus paraplantarum</i> |
| | Z100, Z146. | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> |

| | |
|-------------|-------------------------------|
| Z155, Z156. | <i>Staphylococcus equorum</i> |
| Z19. | <i>Lactococcus garviae</i> |
| Z153, Z157. | <i>Serratia sp.</i> |

Tabella 39: Risultati della caratterizzazione genomica dei batteri lattici.

Anche nella toma caprina prodotta presso Alpe Mera i Batteri lattici riscontrati nel latte crudo e durante la caseificazione sono ascrivibili al genere *Lactococcus*, *Staphylococcus* e *Leuconostoc*. Tuttavia la microflora risulta maggiormente varia in quanto si rileva la presenza di *Lactobacillus paraplantarum* e *Pediococcus pentosaceus* a differenza di quanto osservato nei due caseifici analizzati in precedenza.

4.4.3 RIASSUNTO CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

L'identificazione molecolare è avvenuta mediante parziale sequenziamento della regione 16S rRNA. Tale regione è stata scelta in quanto, ad oggi, è considerata ancora una delle porzioni più significative ai fini della collocazione tassonomica dei vari microrganismi ed è quella per la quale abbiamo la disponibilità di un maggior numero di sequenze cui fare riferimento nei database.

CARCOFORO

Nel latte crudo la microflora lattica è risultata poco varia. Le forme a cocco omofermentanti sono preponderanti e per lo più rappresentate da lattococchi seguiti dagli enterococchi. Nello specifico tra i lattococchi le specie dominanti sono *Lactococcus lactis* e *Lactococcus garviae* mentre tra gli enterococchi ritroviamo *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis*.

Nel latte crudo sono state ritrovate anche numerose Micrococcaceae classificate poi come *Rothia* spp. e *Staphylococcus* spp. Si tratta di microrganismi tipici della cute la cui provenienza è verosimilmente attribuibile alla mungitura manuale o direttamente all'animale. Le Micrococcaceae ritrovate anche nel prodotto a fine stagionatura svolgerebbero anche un ruolo sensoriale: infatti alcune specie sono pigmentate e contribuiscono alla determinazione dell'aspetto superficiale, inoltre hanno una maggiore attività lipolitica e proteolitica rispetto ai fermenti lattici e sono in grado di metabolizzare aminoacidi e acidi grassi producendo composti importanti per il sapore e l'aroma della toma.

Con l'inizio della trasformazione prendono il sopravvento i lattococchi tra i quali la specie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* risulta dominante. Alcuni ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis* sono in grado di fermentare il citrato (presente nel latte) con produzione di anidride carbonica e sostanze aromatiche come il diacetile che dà il tipico aroma di burro. Altri sono inoltre in grado

di produrre sostanze inibitorie di natura proteica (batteriocine) attive contro patogeni ed agenti di deterioramento. Sempre nel latte e nella cagliata è stata rilevata la presenza, in quantità minoritaria, di *Leuconostoc lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*; essa è una specie batterica etero fermentante mesofila o psicrofila usata nei prodotti lattiero caseari spesso in associazione con il *Lc. lactis* per la loro capacità di fermentare il citrato con produzione di sostanze aromatiche. Dal momento che producono anidride carbonica (un gas) per fermentazione degli zuccheri e del citrato, possono determinare una lieve occhiatura nei formaggi.

L'allontanamento del siero, la posa in stufatura e la successiva salatura realizzano condizioni più favorevoli ad altre forme a cocco costituite per lo più da Enterococchi che, con la specie *faecalis*, diventano il gruppo microbico dominante. Questi sono frequentemente presenti nella microflora di prodotti artigianali dove potenzialmente svolgono un ruolo importante sia nella determinazione delle proprietà sensoriali (contribuendo a lipolisi e proteolisi dei substrati organici) sia per la sicurezza igienica (producendo sostanze inibitorie verso microrganismi patogeni). Tuttavia la presenza in queste specie di ceppi patogeni (responsabili di infezioni nosocomiali, gastroenteriti, endocarditi) talvolta resistenti ad antibiotici e la capacità di produrre amine biogene per decarbossilazione di aminoacidi rendono questo gruppo in un certo qual modo sospetto almeno dal punto di vista prettamente clinico.

A conferma comunque dell'importanza degli enterococchi nella caratterizzazione aromatica del prodotto, la specie *E. faecalis* si ritrova nella pasta del prodotto finito accanto a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e a *Streptococcus thermophilus* selezionatosi probabilmente con la stufatura.

CANGELLO

Il latte utilizzato è apparso particolarmente ricco di cocchi lattici rappresentati per lo più da *Lactococcus garviae* seguito da *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Entrambi sono importanti microrganismi coinvolti nella coagulazione e successiva maturazione di prodotti caseari ottenuti da latte crudo. Non trascurabile, benché numericamente inferiore, è la presenza di *Enterococcus faecalis*. Successivamente alla coagulazione si osserva una inversione tra i due lattococchi che comunque si confermano la componente maggioritaria; aumenta inoltre il numero e la biodiversità degli Enterococchi: si riscontrano infatti *Enterococcus faecalis*, *E. durans* ed *E. gilvus*. Quest'ultimo viene maggiormente ritrovato nella crosta del formaggio e potrebbe derivare da una contaminazione ambientale o direttamente da una contaminazione umana. Il serbatoio di incubazione degli Enterococchi è infatti l'intestino umano o animale il che rende questi possibili veicoli di contaminazione.

Interessante è la presenza di un'ampia varietà batterica osservata durante la stagionatura. Compagno infatti alcune forme a bastoncino etero fermentanti facoltative come il *Lactobacillus*

paraplantarum caratterizzato da una buona attività acidificante e dalla possibilità per alcuni ceppi di essere produttori di batteriocine ed essere utilizzati per il controllo biologico di patogeni; si ritrovano inoltre forme a cocco appartenenti alla famiglia delle Micrococcaceae. In particolare sono stati ritrovati *Staphylococcus equorum* (crosta e pasta) già utilizzato come starter per alcune produzioni casearie e *Kocuria* spp.: entrambi possiedono una buona attività lipolitica, carattere che influisce positivamente sull'aroma del prodotto finito.

ALPE MERA

Dalla classificazione si evince come nel latte crudo la specie più rappresentata sia il *Lactococcus garviae* seguita da *Leuconostoc lactis* e da *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Lactococcus garviae* si conferma la principale specie microbica presente sino a dopo la salamoia momento in cui la popolazione batterica inizia ad essere più varia. Ivi viene infatti riscontrata la presenza di *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* accanto a specie diverse di Enterococchi: *Enterococcus faecalis*, seguito da *Enterococcus gilvus*, *E. durans*, *E. casseliflavus* ed *E. faecium*. Durante la stagionatura compaiono anche alcune forme lattiche a bastoncino rappresentate da *Lactobacillus paraplantarum*, che alla fine insieme ad *Enterococcus faecalis* sono state le sole specie isolate sul prodotto finito. Entrambe queste due ultime specie batteriche svolgono un'importante attività peptidasica con formazione di composti aromatici importanti per la definizione della qualità sensoriale del formaggio caprino.

Un'analisi più approfondita può inoltre mettere in evidenza le differenti specie microbiche lattiche riscontrate nella pasta e sulla crosta del prodotto durante la maturazione. Dopo 48 ore dalla formatura la pasta del formaggio è costituita principalmente dalle seguenti forme batteriche coltivabili in piastra: *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactococcus lactis* e *Staphylococcus equorum*. Sulla crosta le forme microbiche lattiche riscontrate sono state: *Enterococcus faecalis*, *E. gilvus*, *E. casseliflavus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Staphylococcus equorum*.

Nel formaggio caprino dopo 15 giorni di stagionatura si riscontra la presenza nella pasta di *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus*. Sulla crosta invece si è ritrovato: *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ed *E. gallinarum*.

Nella toma caprina a fine stagionatura (due mesi) le forme batteriche lattiche ritrovate nella pasta sono state le seguenti: *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* ed *E. gilvus*; nella crosta invece si è constatata la presenza di: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Enterococcus faecalis*, *E. gilvus*, *E. faecium*, *Staphylococcus equorum* e *Serratia proteamaculans*.

4.5 RISULTATI IDENTIFICAZIONE

Nelle figure 82-84 sono riportati i dendogrammi ottenuti dalle specie isolate in ciascun caseificio.

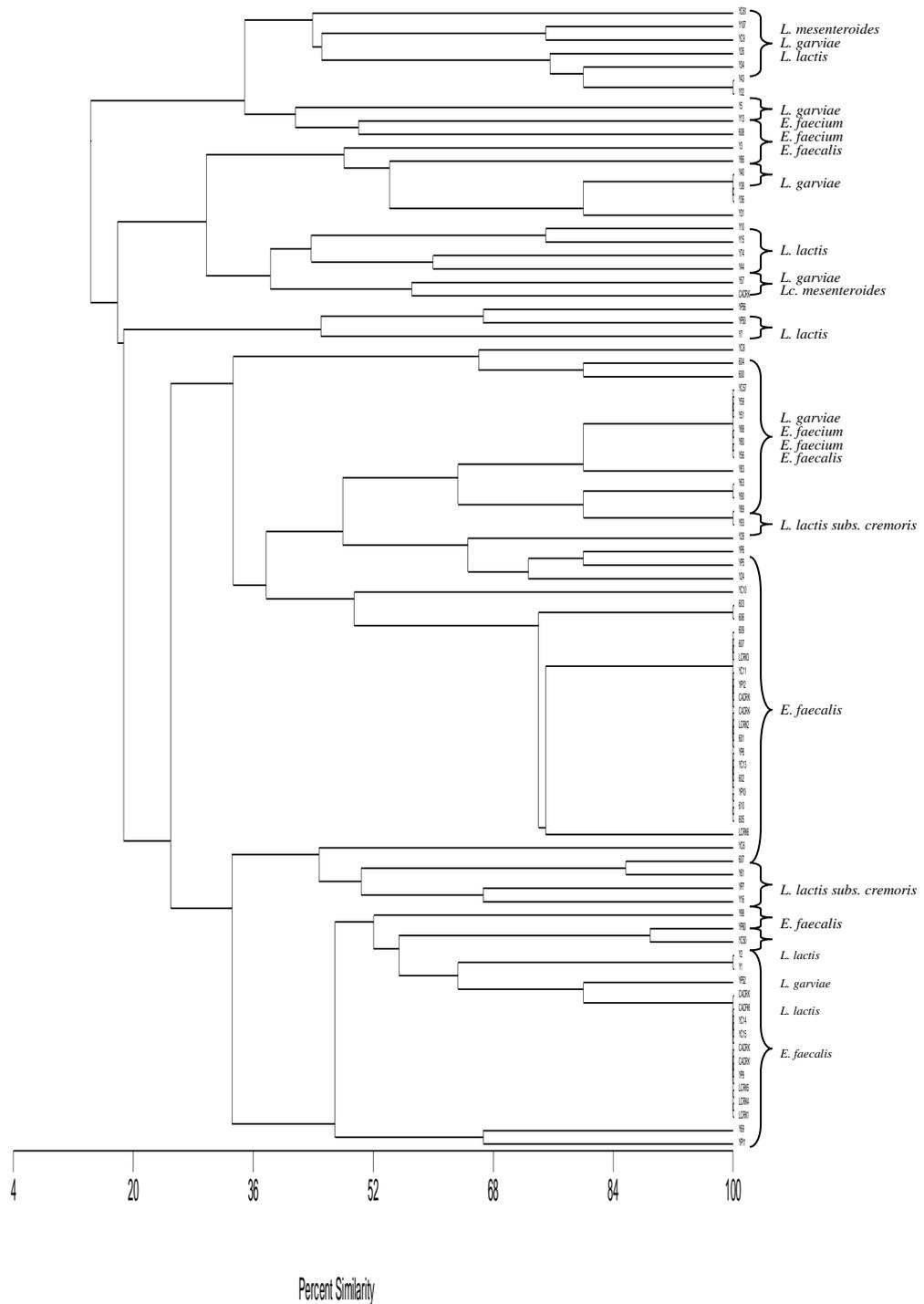


Figura 82: dendrogramma ottenuto dalle specie isolate a Carcoforo

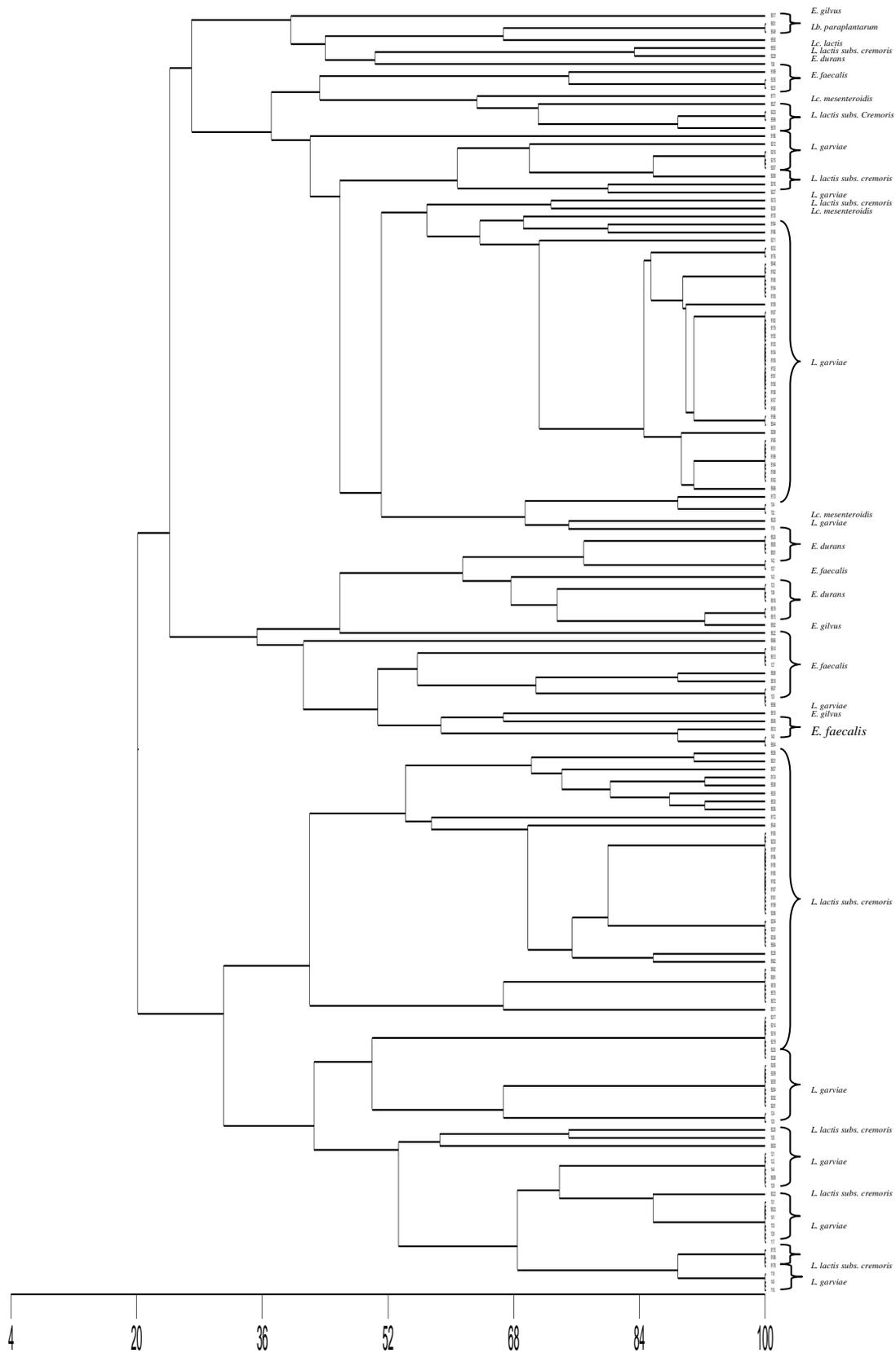


Figura 83: dendrogramma ottenuto dalle specie isolate a Cangelo.

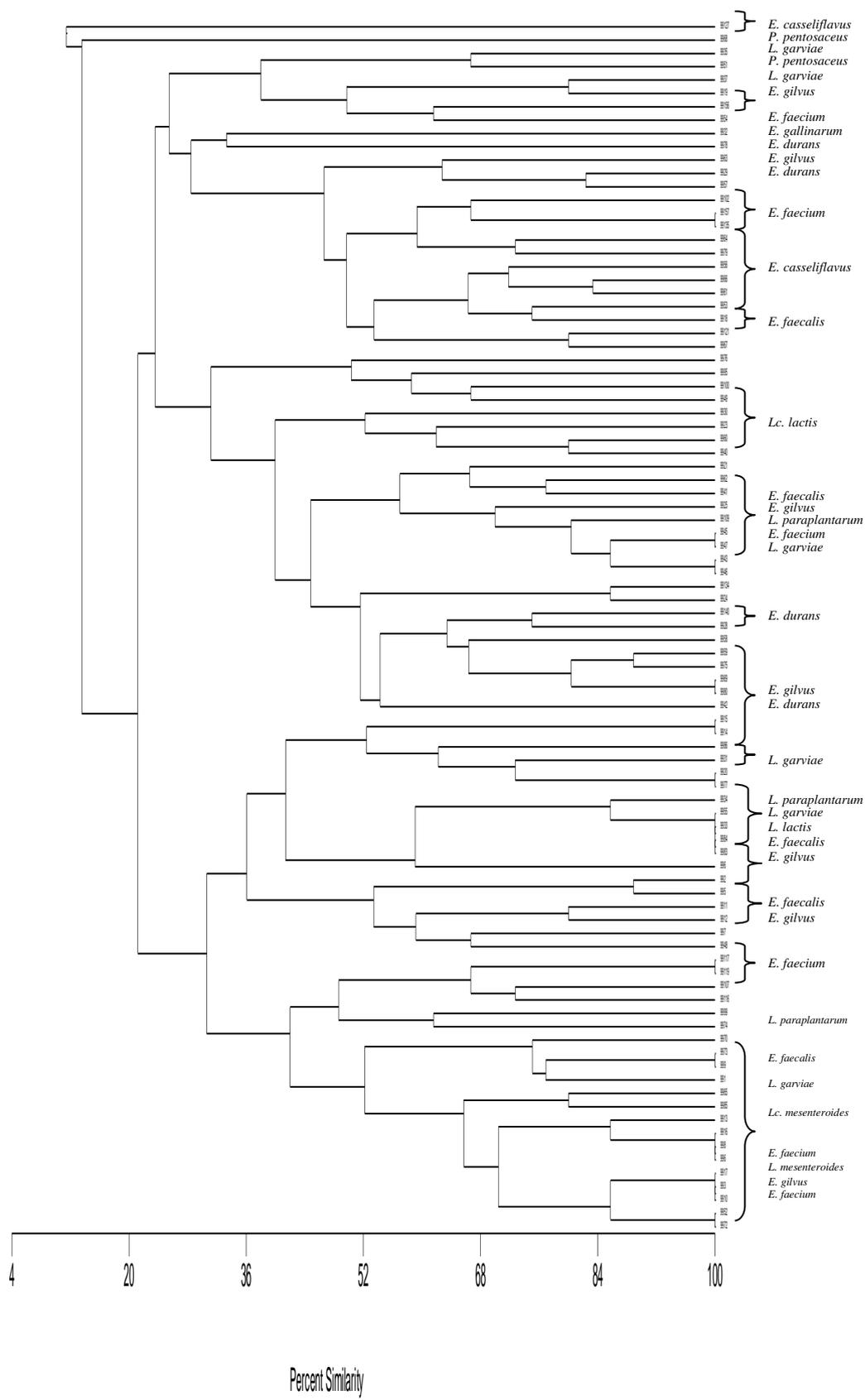


Figura 84: dendrogramma ottenuto dalle specie isolate ad Alpe Mera

4.6 RISULTATI STUDIO DELLE COMUNITÀ BATTERICHE CON METODI BIOMOLECOLARI

4.6.1 LH-ANALYSIS (LENGTH HETEROGENEITY – ANALYSIS)

Il DNA dei batteri isolati su terreni selettivi e differenziali ed identificati mediante parziale sequenziamento del 16S rDNA nonché il DNA totale (direttamente estratto dalla matrice alimentare e contenente il genoma di tutti i batteri presenti nel substrato) sono stati amplificati con i *primers* marcati con fluorofori per essere sottoposti ad analisi LH-PCR. L'amplificazione dei ceppi puri per la costruzione del *database* contenente le *size* relative a ciascuna specie batterica è utile per l'identificazione mediante confronto e sovrapposizione dei picchi ottenuti dai profili elettroforetici di tutti gli step produttivi del formaggio. La parte iniziale del lavoro è consistita essenzialmente nella scelta di *primers* che amplificassero sulla porzione dell'operone ribosomale 16S regioni variabili e dunque discriminanti dal punto di vista tassonomico fra i microrganismi propri di quel substrato. La scelta di questi è stata effettuata consultando la bibliografia specifica ed è inizialmente ricaduta sull'uso dei *primers* utilizzati da Suzuki (40) in uno dei primi lavori sulle comunità microbiche che utilizzava la tecnica LH-PCR. In questo lavoro Suzuki studiava la frequenza degli ampliconi ottenuti dal pikoplancton delle acque marine dell'Oregon. I *primers* in questione amplificavano i domini variabili V1-V2 e V1-V3 (riportati in blu e bianco nella tabella 40). Nel mio lavoro tali primers sono stati utilizzati con due differenti marcatori fluorescenti in maniera da stabilire quali fornissero i profili migliori da un punto di vista della separazione dei picchi elettroforetici e di sensibilità. I *primers* utilizzati con le diverse marcature sono indicati in blu, bianco, rosa e arancio in tabella 40.

Successivamente sono stati utilizzati anche i *primers* utilizzati da Lazzi *et al.* (indicati in giallo nella tabella 40) per amplificare i batteri presenti nei latte innesti aggiunti durante la produzione di Grana Padano (12). Tali *primers* amplificavano i domini variabili V1-V2 ma con un punto di inizio di copiatura del *forward* differente rispetto al quello del *forward* della coppia utilizzata da Suzuki. Quest'ultima scelta era stata fatta per la vicinanza del substrato su cui ha lavorato Lazzi con i nostri campioni (latte, formaggio e relativi intermedi di produzione)

| Primers/fluoroforo | Codifica coppia | Sequenza | Target |
|--------------------|-----------------|---|----------------------|
| 27F-FAM e 335R | a | 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 335R (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') | V1-V2 16S rRNA |
| 27F-FAM e 536R | b | 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 536R (5'-GATTACCGCGGCKGCTG-3') | V1-V3 16S rRNA |
| 27F-HEX e 335R | c | 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 335R (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') | V1-V2 16S rRNA |

| | | | |
|----------------|----------|---|----------------------|
| 27F-HEX e 536R | d | 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 536R (5'-GATTACCGCGGCKGCTG-3') | V1-V3 16S rRNA |
| 63F-FAM e 335R | e | 63F(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'); 355R(5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') | V1-V2 16S rRNA |

Tabella 40: elenco primers testati

Prima di effettuare l'amplificazione dei ceppi puri per la costruzione del *database* sono state effettuate con tutte le coppie di *primers* prove di contaminazione per valutare la sensibilità del metodo LH-PCR. Il formaggio è stato addizionato con un numero noto di cellule di batteri a differenti diluizioni. I microrganismi utilizzati allo scopo sono stati: *Enterococcus faecalis* DSMZ 20478, *Pseudomonas stutzeri*, *Brochotrix campestris* DSM 4712 e *Listeria innocua* DSM 20649.

Sono state allestite soluzioni con una carica microbica per ciascun microrganismo contaminante da aggiungere ad un campione di formaggio finito pari a 10^5 cellule/mL e pari a 10^2 cellule/mL. Inoltre con minilisi è stato estratto il DNA dalle colture batteriche dei ceppi usati per la contaminazione. I primers utilizzati per le amplificazioni, i campioni sui quali sono stati effettuati e il risultato dell'amplificazione sono visibili nella tabella 41. La foto del gel in cui si vede l'intensità delle bande dell'amplificato ottenuto dal DNA estratto dal formaggio normale e contaminato e dal DNA dei ceppi contaminanti sono invece visibili nelle figure 85 e 86 rispettivamente. Per l'interpretazione delle codifiche riportate in foto si faccia riferimento alla tabella 41.

| Codifica | DNA | Primers | Amplificazione |
|----------|--|------------------|----------------|
| B a | DNA ceppo puro <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 | 27F-FAM and 335R | + |
| E a | DNA ceppo puro <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 | 27F-FAM and 335R | + |
| L a | DNA ceppo puro <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 | 27F-FAM and 335R | + |
| P a | DNA ceppo puro <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 27F-FAM and 335R | + |
| B b | DNA ceppo puro <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 | 27F-FAM and 536R | - |
| E b | DNA ceppo puro <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 | 27F-FAM and 536R | - |
| L b | DNA ceppo puro <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 | 27F-FAM and 536R | - |
| P b | DNA ceppo puro <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 27F-FAM and 536R | - |
| B c | DNA ceppo puro <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 | 27F-HEX and 335R | - |
| E c | DNA ceppo puro <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 | 27F-HEX and 335R | - |
| L c | DNA ceppo puro <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 | 27F-HEX and 335R | - |
| P c | DNA ceppo puro <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 27F-HEX and 335R | +/- |
| B d | DNA ceppo puro <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 | 27F-HEX and 536R | - |
| E d | DNA ceppo puro <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 | 27F-HEX and 536R | + |
| L d | DNA ceppo puro <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 | 27F-HEX and 536R | + |

| | | | |
|-----|---|------------------|-----|
| P d | DNA ceppo puro <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 27F-HEX and 536R | + |
| B e | DNA ceppo puro <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 | 63F-FAM and 335R | - |
| E e | DNA ceppo puro <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 | 63F-FAM and 335R | + |
| L e | DNA ceppo puro <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 | 63F-FAM and 335R | + |
| P e | DNA ceppo puro <i>Pseudomonas stutzeri</i> | 63F-FAM and 335R | + |
| 1 a | Formaggio puro | 27F-FAM and 335R | +/- |
| 2 a | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 3 a | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 4 a | Formaggio contaminato <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 5 a | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 6 a | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 7 a | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 8 a | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 9 a | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 335R | + |
| 1 b | Formaggio puro | 27F-FAM and 536R | + |
| 2 b | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 3 b | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 4 b | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 5 b | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 6 b | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 7 b | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 8 b | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 9 b | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-FAM and 536R | + |
| 1 c | Formaggio puro | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 2 c | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 3 c | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 4 c | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 5 c | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> | 27F-HEX and 335R | +/- |

| | | | |
|-----|---|------------------|-----|
| | DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | | |
| 6 c | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 7 c | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 8 c | Formaggio contaminato con soluz di <i>Pseudomonas stutzeri</i> pari a 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 9 c | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 335R | +/- |
| 1 d | Formaggio puro | 27F-HEX and 536R | + |
| 2 d | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 3 d | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 4 d | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 5 d | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 6 d | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 7 d | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 8 d | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 9 d | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 27F-HEX and 536R | + |
| 1 e | Formaggio puro | 63F-FAM and 335R | + |
| 2 e | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 3 e | Formaggio contaminato con <i>Brochotrix campestris</i> DSM 4712 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 4 e | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 5 e | Formaggio contaminato con <i>Enterococcus faecalis</i> DSMZ 20478 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 6 e | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ⁵ cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 7 e | Formaggio contaminato con <i>Listeria innocua</i> DSM 20649 in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 8 e | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> pari a 10 ⁵ cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |
| 9 e | Formaggio contaminato con <i>Pseudomonas stutzeri</i> in concentrazione di 10 ² cellule/mL | 63F-FAM and 335R | + |

Tabella 41 : prove di contaminazione per valutare la sensibilità del metodo LH-PCR effettuate con diverse coppie di primers. Nella prima colonna sono indicate le codifiche dei campioni, nella seconda il campione amplificato, nella terza la coppia di primers e nell'ultima il risultato dell'amplificazione.

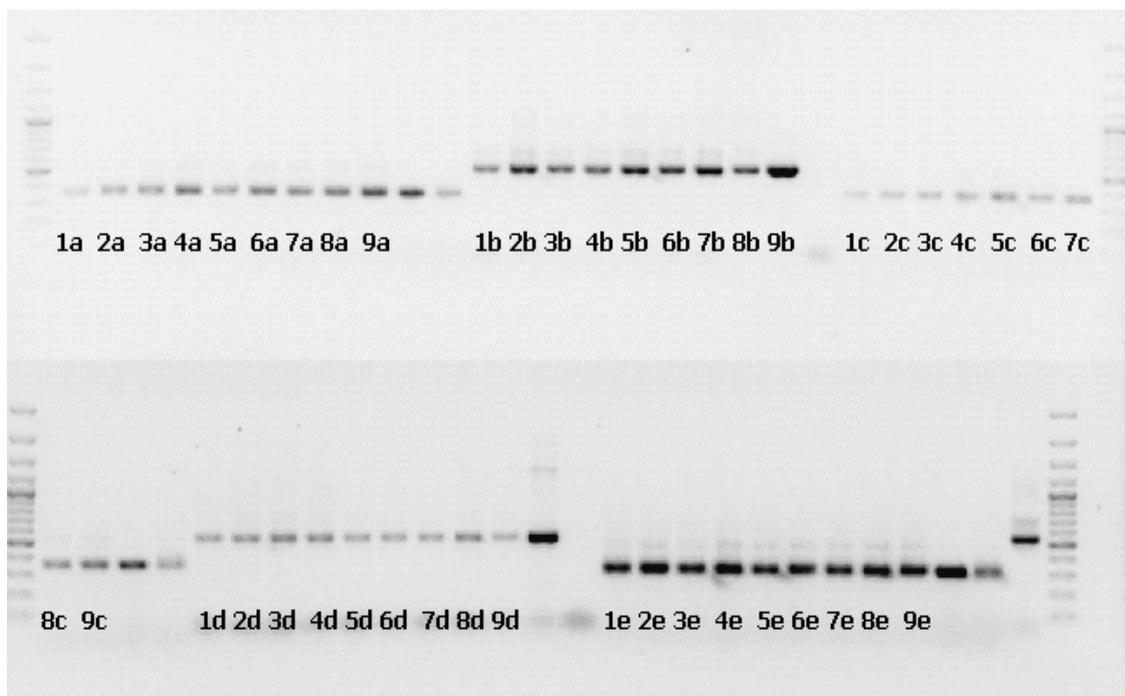


Figura 85: gel di verifica dell'amplificazione in seguito alle prove di contaminazione.

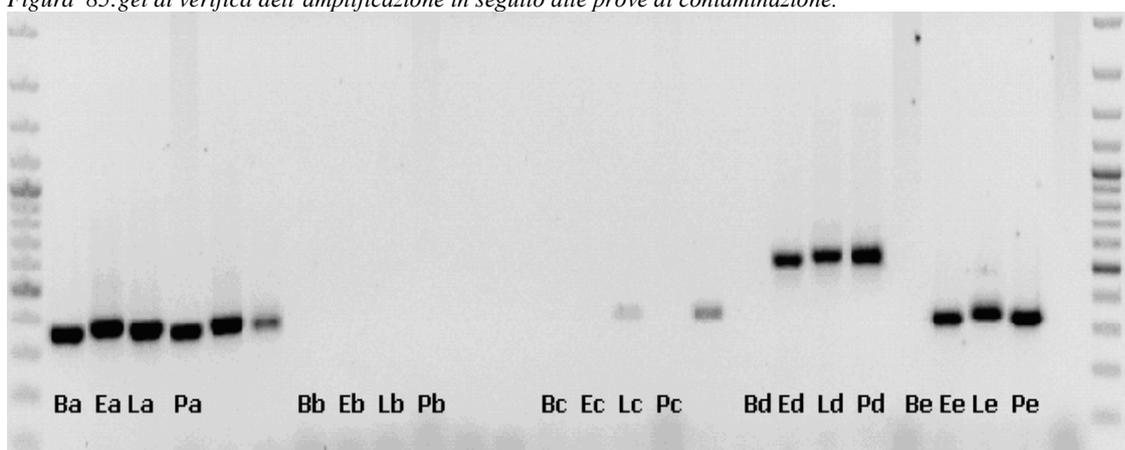


Figura 86: gel di verifica dell'amplificazione in seguito alle prove di contaminazione.

Come si può notare i *primers* che hanno dato una maggiore quantità di amplificato sulle comunità contaminate sono stati quelli utilizzati da Lazzi *et al.* (63F-FAM and 335R).

Per quanto riguarda invece l'amplificazione del DNA estratto dai ceppi puri utilizzati per la contaminazione questa ha dato esito negativo su tutti i ceppi per le coppie di *primers* 27F-FAM-536R e 27F-HEX-335R (eccettuato un lieve positivo per *Listeria innocua* DSM 20649 in quest'ultima coppia): questo a dimostrazione che non solo la regione di amplificazione ma anche il tipo di fluoroforo utilizzato influisce sull'esito della PCR. *Brochotrix campestris* DSM 4712 invece non è stato amplificato neppure dalle coppie di *primers* 27F-HEX-536R e 63F-FAM-335R dove tutti gli altri ceppi hanno risposto positivamente all'amplificazione.

Successivamente tutti i campioni amplificati con i *primers* marcati con il fluoroforo riportati nella tabella 41 sono stati caricati nel sequenziatore (ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Gli ampliconi fluorescenti dopo corsa nella colonna elettroforetica in condizioni denaturanti hanno

emesso una fluorescenza che, tramite apposito software Genescan, ha prodotto gli elettroferogrammi relativi riportati nelle figure 87-91.

Dall'osservazione degli elettroferogrammi ottenuti con le diverse coppie di *primers a,b,c* e *d* (vedi codifica in tabella 40) ed i differenti fluorofori possiamo osservare come le curve relative ai formaggi puri ed ai formaggi contaminati diano uno scarso numero di picchi. Questo si traduce nel fatto che la composizione batterica del formaggio, benché potenzialmente composita, si concentri tutta al di sotto dei pochi picchi maggioritari impedendo così la discriminazione tra le diverse specie. Ciò è verosimilmente attribuibile ad una scarsa eterogeneità di lunghezza delle specie nelle zone amplificate dai *primers* testati. Questo problema è molto meno marcato per i profili ottenuti dalla coppia *a*: per essi infatti abbiamo il maggior numero di picchi rispetto a quelli presenti nei profili suddetti ma va tuttavia accentuandosi passando dalla coppia *b* a quella *d* dove, addirittura, abbiamo ottenuto un unico picco. Altra considerazione importante è che con le coppie di *primers a,b,c* e *d* non si è mai riusciti ad individuare nel profilo elettroforetico alcun picco dato dai quattro ceppi contaminanti utilizzati neppure quando la contaminazione era effettuata con sospensioni di batterio più elevate (10^5 cellule/mL). Dunque i profili ottenuti dai formaggi puri sono risultati identici a quelli ottenuti dai formaggi contaminati.

La situazione è apparsa diversa invece per la coppia di primers *e*. Infatti con questi si sono ottenuti profili con il maggior numero di picchi (14) rispetto agli altri ed è stato inoltre possibile “detectare” sugli elettroferogrammi i picchi determinati dalla contaminazione con *Enterococcus faecalis* DSMZ 20478 (sospensione pari a 10^5 cellule/mL) e *Pseudomonas stutzeri* (sospensione pari a 10^5 cellule/mL) a 329 bp (paia di basi o *base pairs*) e 307 bp rispettivamente. Questo è visibile nella figura 91 nella quale sono indicati i picchi dei contaminanti. *Brochothrix campestris* DSM 4712 e *Listeria innocua* DSM 20649 non hanno determinato la comparsa di picchi (attesi a 321 e 315 pb rispettivamente) nel profilo del formaggio contaminato con essi neppure quando aggiunti al campione alle concentrazioni più elevate. Le prove di contaminazione con i due ceppi “detectati” sono state successivamente effettuate sul formaggio anche alle diluizioni intermedie (ovvero 10^4 e 10^3 cellule/mL) ma il limite di *detection* è rimasto 10^5 cellule/mL dato peraltro confermato anche in letteratura (12). Questo dunque ci ha fornito indicazioni anche circa la sensibilità del metodo LH-PCR.

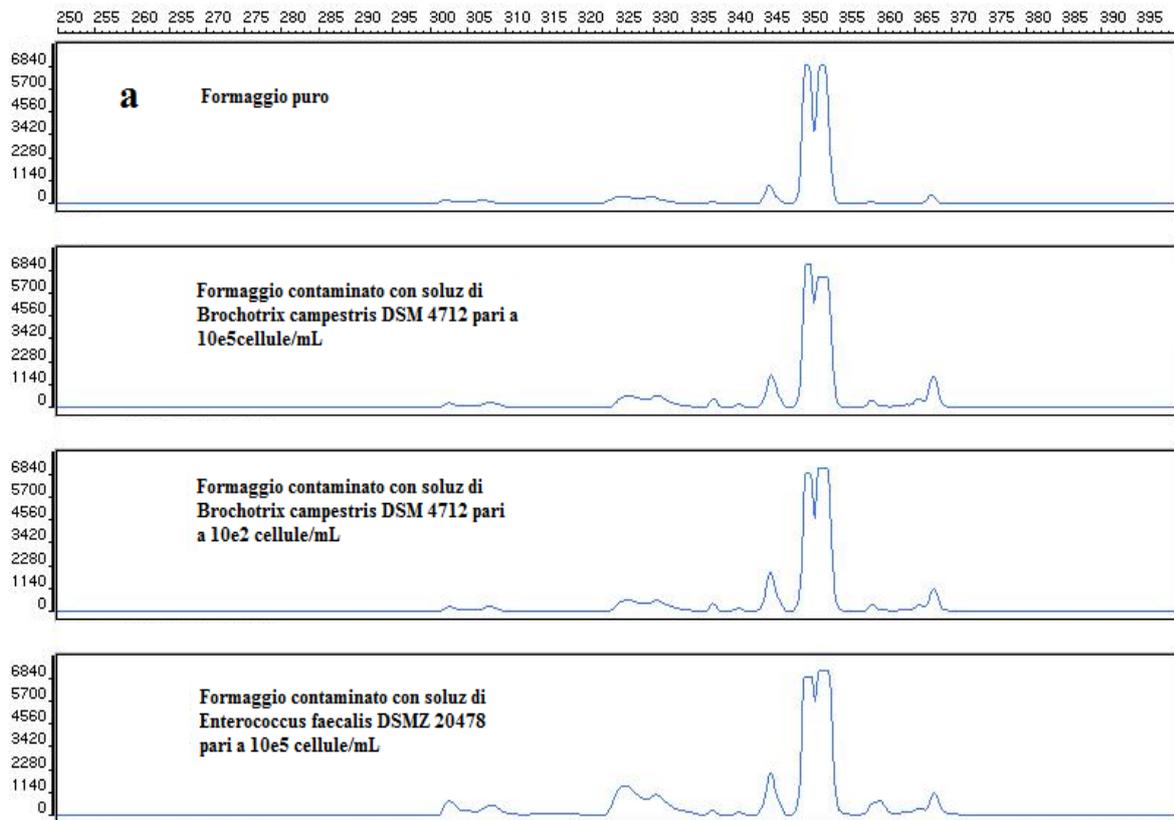


Figura 87: elettroferogrammi ottenuti dalla prova di contaminazione con la coppia di primers 27F-FAM e 335R.

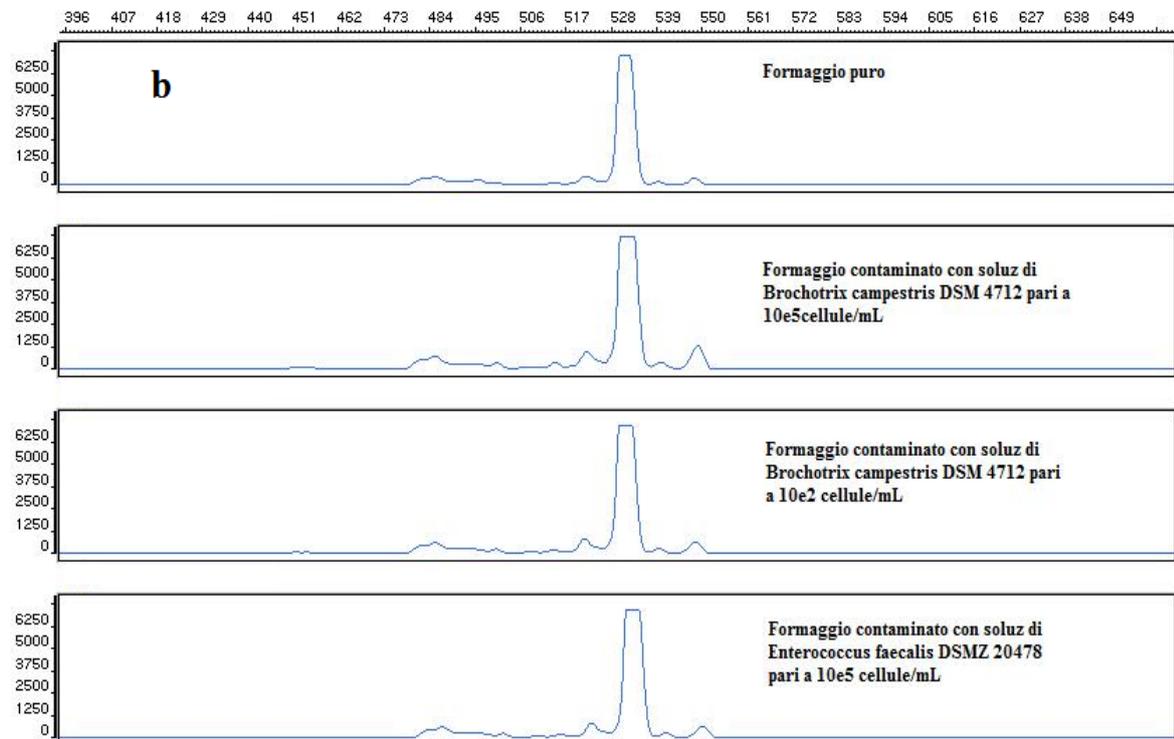


Figura 88: elettroferogrammi ottenuti dalla prova di contaminazione con la coppia di primers 27F-FAM e 536R.

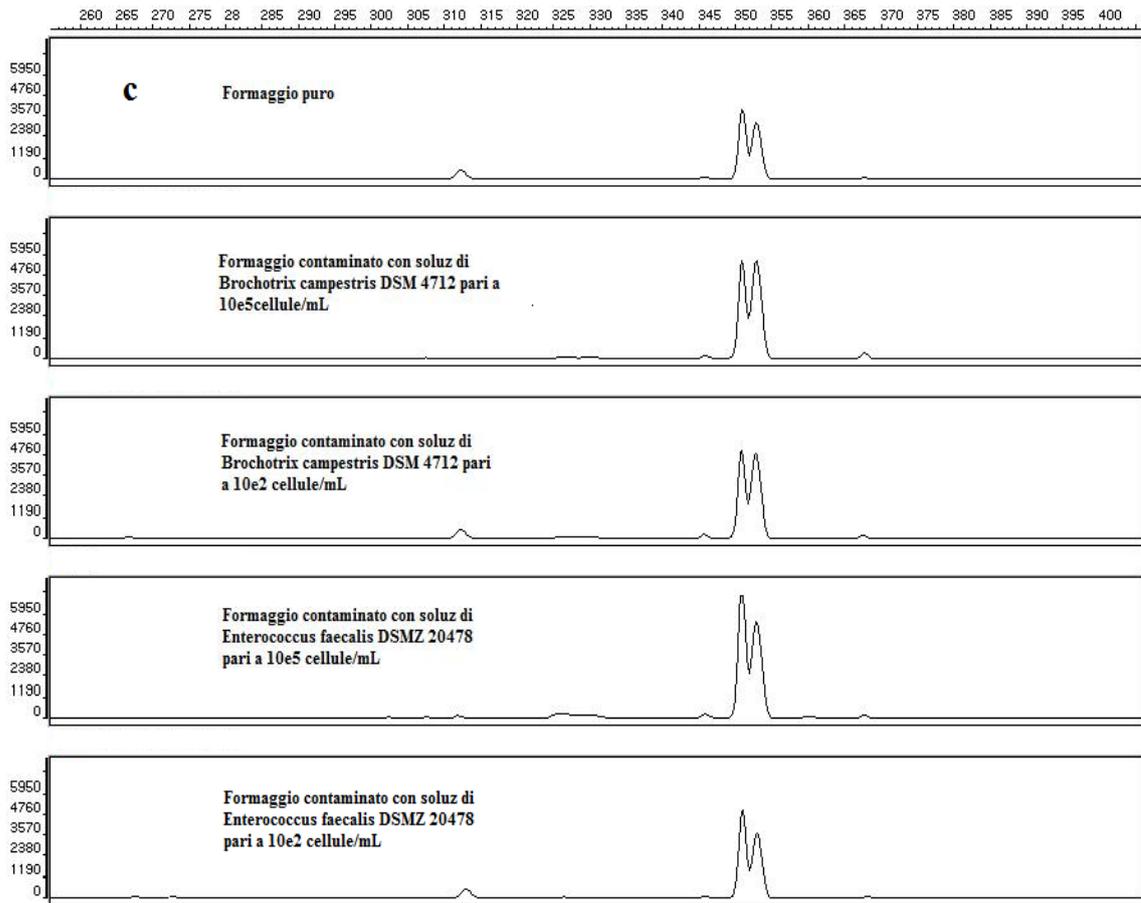


Figura 89: elettroferogrammi ottenuti dalla prova di contaminazione con la coppia di primers 27F-HEX e 335R.

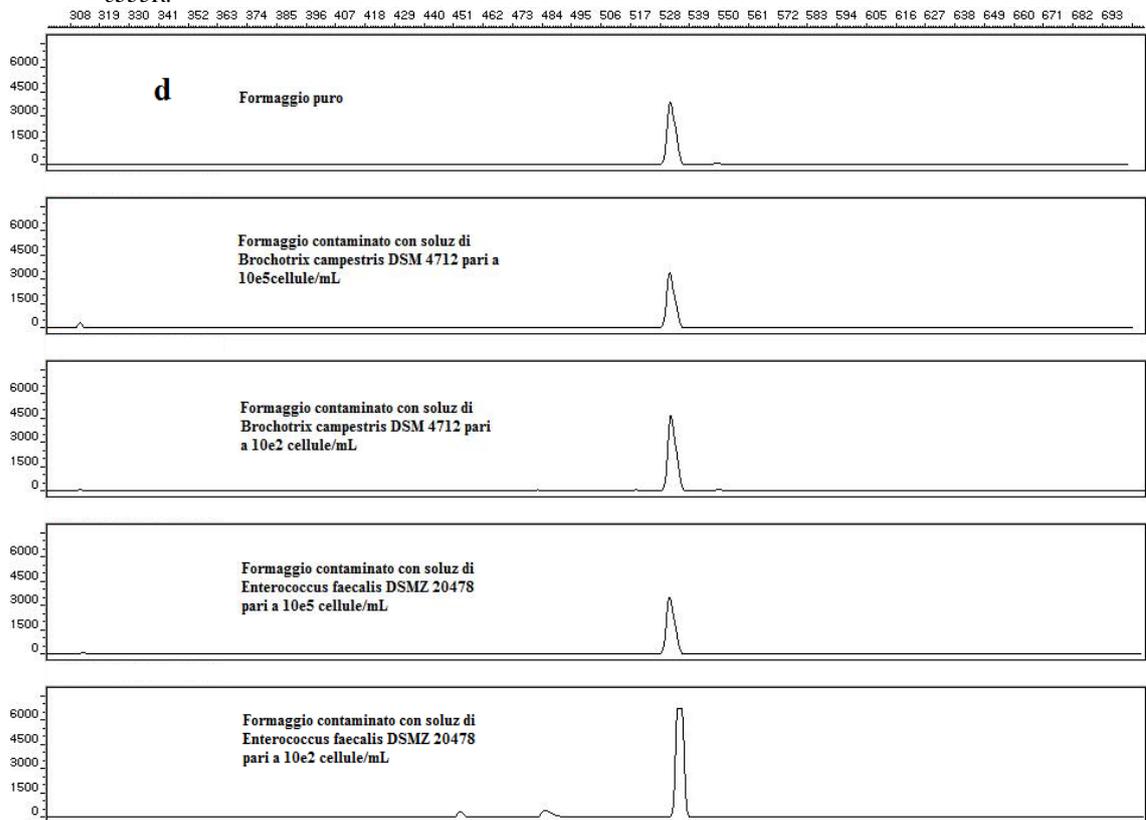


Figura 90: elettroferogrammi ottenuti dalla prova di contaminazione con la coppia di primers 27F-HEX e 536R.

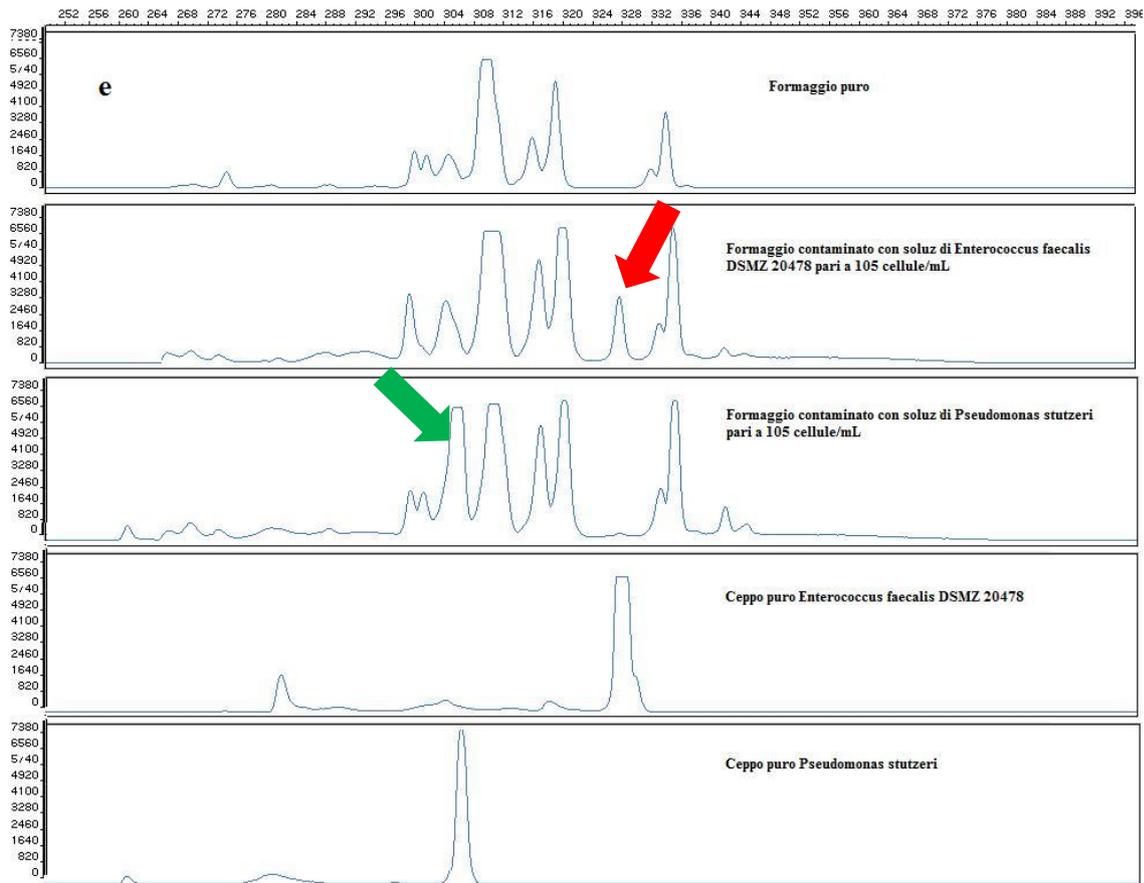


Figura 91: la freccia rossa indica la comparsa nel profilo del picco di *Enterococcus faecalis* DSMZ 20478 (soluzione pari a 10^5 cellule/mL) mentre la freccia verde indica la comparsa del picco di *Pseudomonas stutzeri* (soluzione pari a 10^5 cellule/mL). I picchi generati dai relativi ceppi puri sono illustrati nei due elettroferogrammi sottostanti.

Dopo aver individuato la coppia **e** (Lazzi *et al.*) come la più idonea all'amplificazione del DNA totale si è proceduto con essi all'amplificazione dei ceppi puri isolati (sugli esponenti dei *clusters* realizzati in seguito al sequenziamento 16S rRNA) per procedere poi, in seguito alla corsa in capillare elettroforetico, alla creazione del *database*.

Tuttavia sui ventisei ceppi amplificati solo dieci hanno dato esito positivo dopo amplificazione (Risultati nella tabella 42). Si sono fatti ulteriori tentativi variando le temperature di *annealing* nonché le quantità di DNA ma non si è riusciti ad ottenere un numero maggiore di amplificati.

Dopo questo ostacolo è stata presa nuovamente in considerazione la coppia di *primers a* che, come già detto, amplifica i domini variabili V1-V2 ma con un punto di inizio di copiatura del *forward* differente rispetto a quello della coppia utilizzata da Suzuki. I risultati dell'amplificazione sono mostrati ancora nella tabella 41). In questo caso solo quattro ceppi sui ventisei totali hanno dato un risultato negativo mentre tre hanno presentato solo una debole amplificazione.

Tuttavia con i *primers a* sussisteva ancora il problema del limitato numero di picchi rilevati nelle comunità oltre che della mancata *detection* di batteri anche ad elevate concentrazioni (10^5 cellule/mL).

| | Genere e specie | Amplificazione con primers e | Amplificazione con primers a |
|----|--|------------------------------|------------------------------|
| 1 | <i>Acinetobacter sp.</i> | + | + |
| 2 | <i>Enterococcus faecalis</i> NRIC 0113 | - | + |
| 3 | <i>Enterococcus faecium</i> RJ16 | + | + |
| 4 | <i>Enterococcus gilvus</i> | + | + |
| 5 | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | + | + |
| 6 | <i>Enterococcus gallinarum</i> | + | + |
| 7 | <i>Enterococcus faecalis</i> PFK3 | + | + |
| 8 | <i>Enterococcus durans</i> | + | + |
| 9 | <i>Enterococcus faecium</i> STP | + | +/- |
| 10 | <i>Enterococcus faecium</i> C228 | - | + |
| 11 | <i>Kocuria rhizophila</i> | - | + |
| 12 | <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | - | + |
| 13 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | + | + |
| 14 | <i>Lactococcus garvie</i> | - | + |
| 15 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | - | - |
| 16 | <i>Leuconostoc lactis</i> | - | + |
| 17 | <i>Leuconostoc citreum</i> | - | + |
| 18 | <i>Microbacterium lacticum</i> | - | + |
| 19 | <i>Pediococcus pentosaceus</i> | - | + |
| 20 | <i>Pseudomonas synxantha</i> | - | - |
| 21 | <i>Rothia sp.</i> | + | + |
| 22 | <i>Serratia proteamaculans</i> | - | - |
| 23 | <i>Staphylococcus equorum</i> | - | + |
| 24 | <i>Staphylococcus xilosus</i> | - | - |
| 25 | <i>Streptococcus parauberis</i> | - | +/- |
| 26 | <i>Streptococcus thermophilus</i> | - | +/- |

Tabella 42: risultato dell'amplificazione dei ceppi puri con la coppia di primers 63F-FAM e 335R.

Per questa ragione dopo ulteriore analisi bibliografica si è pensato di amplificare il DNA dei ceppi puri isolati ed il DNA totale con una nuova coppia di *primers* utilizzata, in realtà per l'analisi SSCP (75). In questa metodica gli ampliconi anziché correre nel capilare elettroforetico in condizioni denaturanti corrono in condizioni non denaturanti e la discriminazione fra i differenti frammenti non avviene più sulla base delle eterogeneità di lunghezza in termini di basi azotate ma sulla base della sequenza di esse e, dunque del ripiegamento che i frammenti assumono quando rinaturano.

Tali *primers* (nomi e sequenza riassunti nella tabella 43) amplificano la regione V2 e la regione V3 separatamente come illustrato in figura 92. La prima coppia di primers presenta una doppia marcatura con fluoroforo sia sul *reverse* che sul *forward* mentre la seconda solo sul *forward*.

| Primer-fluoroforo | Codifica coppia | sequenza | Target |
|--------------------|----------------------|---|-------------|
| V2F-HEX V2R-NED | f-HEX e f-NED | V2F (5'-GGCGAACGGGTGAGTAA-3') V2R (5'-ACTGCTGCCTCCCGTAG-3') | V2 16S rRNA |
| w34-NED w49 | g | w34 (5'-TTACCGCGGCGTGCTGGCAC-3') w49 (5'-CGGTCCAGACTCCTACGGG-3') | V3 16S rRNA |

Tabella 43

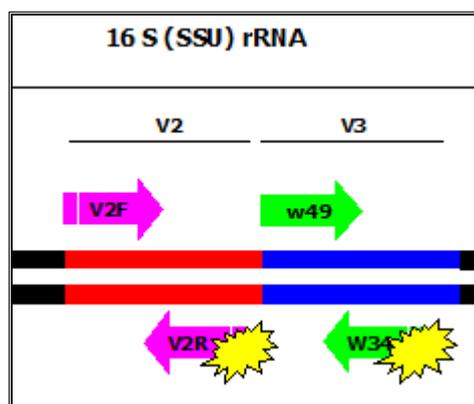


Figura 92

Con le coppie di primers **f** e **g** l'amplificazione del DNA totale e dei ceppi puri ha avuto esito positivo così che tutti gli ampliconi sono stati caricati nell'ABI Prism 310 per essere sottoposti a scansione. In tabella 44 sono riportate le sigle dei campioni o comunità sottoposte all'analisi.

| | | |
|------------------|------------------|---------------------------------|
| Carcoforo | 1 crf | Latte |
| | 2crf | Cagliata |
| | 3crf | Formaggio dopo stufatura |
| | 4crf | Formaggio dopo salamoia |
| | formaggio | Formaggio finito (40 gg) |
| Cangelo | 1cngl | Latte |
| | 2cngl | Cagliata |
| | 3cngl | Formaggio dopo salamoia |
| | 4cngl | Formaggio finito (40 gg) |
| Alpe Mera | 1Me | Latte |
| | 2Me | Cagliata |
| | 3Me | Formaggio (48 h) |
| | 4Me | Formaggio (15 gg) |
| | 5Me | Formaggio (2 mesi) |

Tabella 44: codifiche dei campioni amplificati con le coppie di primers **f** e **g** per ciascun caseificio.

Dall'analisi effettuata sugli elettroferogrammi ottenuti dalle corse del DNA totale nonché dai ceppi puri si è potuto osservare come i profili ottenuti dalle comunità abbiano dato in generale

(sia in V2 con entrambi i coloranti che in V3) un basso numero di picchi che presentano un'altezza superiore a 150 unità di fluorescenza (valore più basso considerabile).

Nelle figure 93-95 sono rappresentati i profili ottenuti dalle comunità di tutti e tre i caseifici con le coppie di *primers* **f-HEX** e **f-NED** (V2 con i due diversi fluorofori) e **g** (V3). Qui tutti gli *step* produttivi dal latte al formaggio finito per ciascun caseificio sono sovrapposti e rappresentati da colori diversi in un unico grafico così da vedere l'evoluzione del profilo durante la produzione del formaggio (consultare la legenda in figura e codifiche in tabella 44). In V2 HEX infatti otteniamo un numero massimo di picchi pari a 5 ed un minimo pari addirittura ad 1 per quanto riguarda il caseificio di Carcoforo, un numero massimo di picchi pari a 5 ed un minimo pari a 2 a Cangelo e 3 picchi per tutti i campioni a Mera.

In V2 NED rileviamo un numero massimo di picchi pari a 4 ed un minimo pari addirittura ad 1 a Carcoforo, un numero massimo di picchi pari a 4 ed un minimo pari a 3 a Cangelo ed infine un massimo di 6 picchi ed un minimo di 2 picchi a Mera.

In V3 infine otteniamo un massimo di 8 picchi ed un minimo di 3 picchi a Carcoforo, un massimo di 12 ed un minimo di 2 a Cangelo e, infine un massimo di 10 ed un minimo di 2 a Mera.

I profili V3 hanno dato un numero maggiore di picchi rispetto ai due profili V2. In generale la regione V2 consente di discriminare meglio tra le specie mentre la regione V3 consente di vedere meglio i generi. Dunque potremmo verosimilmente affermare che nei nostri campioni vi sia una grande varietà di generi differenti piuttosto che non di specie.

Nelle figure 96-98 sono invece rappresentati i profili con i picchi dominanti dei ceppi puri isolati ottenuti ancora con le coppie di *primers* **f-HEX** e **f-NED** (V2 con i due diversi fluorofori) e **g** (V3).

Per le codifiche consultare la tabella 45.

| | | | |
|----|--------------------------|----|--------------------------------|
| 1 | <i>Acinetobacter</i> | 15 | <i>Leuc. mesenteroides</i> |
| 2 | <i>E. faecalis</i> | 16 | <i>Leuc. lactis</i> |
| 3 | <i>E. casseliflavus</i> | 17 | <i>Microbacterium lacticum</i> |
| 4 | <i>E. durans</i> | 18 | <i>Pediococcus pentosaceus</i> |
| 5 | <i>E. faecalis PFK3</i> | 19 | <i>Pseudomonas synxantha</i> |
| 6 | <i>E. faecium</i> | 20 | <i>Rothia</i> |
| 7 | <i>E. gallinarum</i> | 21 | <i>Serratia proteamaculans</i> |
| 8 | <i>E. gilvus</i> | 22 | <i>St. aureus</i> |
| 9 | <i>E. coli</i> | 23 | <i>St. equorum</i> |
| 10 | <i>Kocuria rizophila</i> | 24 | <i>St. pasteurii</i> |
| 11 | <i>L. garviae</i> | 25 | <i>St. simulans</i> |
| 12 | <i>L. lactis</i> | 26 | <i>St. xilosus</i> |
| 13 | <i>L. paraplantarum</i> | 27 | <i>Str. parauberis</i> |

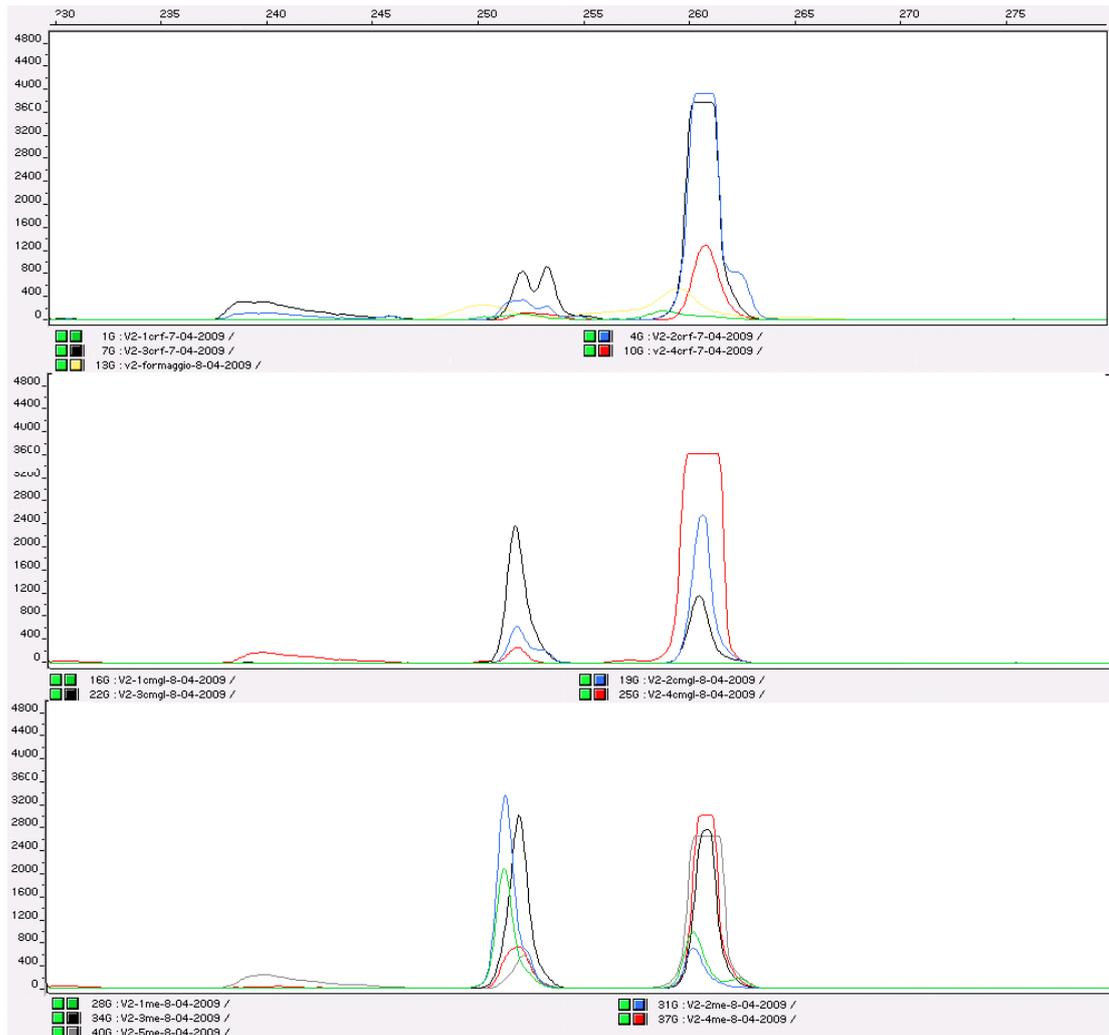
Tabella 45: codifiche dei ceppi puri amplificati per la costruzione del database.

Dalle figure possiamo notare come il problema della comigrazione sia importante e come l'attribuzione di un picco della comunità ad una specie piuttosto che ad un'altra sia impossibile senza riferirsi necessariamente ai risultati degli isolamenti. In questo caso, purtroppo, la realizzazione del *database* contenente il numero di paia di basi caratteristico di ciascun ceppo in V2 o V3 non ha evidentemente senso in quanto in entrambe le regioni amplificate con la coppie di *primers f-HEX*, *f-NED* e *g* tutti i ceppi hanno un'eterogeneità di lunghezza della sequenza massima di 2 o 3 paia di basi. Ad ogni modo, per avere un'idea dei valori in termini di paia di basi di ciascun ceppo puro ottenuti dopo corsa in sequenziatore nella tabella 46. Sono riportati i risultati ottenuti con le coppie *primers f-HEX* e *g*.

| Ceppo Puro | | f-HEX | g |
|-----------------------|---|--------------|----------|
| <i>Enterococcus</i> | <i>faecalis</i> PFK3 | 263.3 | 204.9 |
| <i>Enterococcus</i> | <i>faecium</i> STP | 263.7 | 206.1 |
| <i>Enterococcus</i> | C228 | 263.5 | 205.3 |
| <i>Enterococcus</i> | <i>faecium</i> RJ16 | 263.4 | n.d. |
| <i>Enterococcus</i> | <i>durans</i> | 263.8 | 205.2 |
| <i>Enterococcus</i> | <i>casseliflavus</i> | 263.3 | 205.1 |
| <i>Enterococcus</i> | <i>gallinarum</i> | 261.5 | 206.2 |
| <i>Lactococcus</i> | <i>lactis</i> subps <i>cremoris</i> o <i>lactis</i> | 262.0 | 206.1 |
| <i>Pediococcus</i> | <i>pentosaceus</i> | 262.9 | 205.1 |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>equorum</i> | 261.7 | n.d. |
| <i>Streptococcus</i> | <i>parauberis</i> | 262.6 | 206.1 |
| <i>Streptococcus</i> | <i>thermophilus</i> | 262.3 | 205.8 |
| <i>Acinetobacter</i> | <i>sp.</i> | 261.7 | n.d. |
| <i>Rothia</i> | <i>sp.</i> | 261.1 | n.d. |
| <i>Kocuria</i> | <i>rhizophila</i> | n.d. | 206.0 |
| <i>Microbacterium</i> | <i>lacticum</i> | 178.8 | n.d. |
| <i>Lactobacillus</i> | <i>paraplantarum</i> | 131.9 | 205.0 |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>lactis</i> | 262.4 | 205.0 |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>synxantha</i> | 253.0 | 204.8 |
| <i>Serratia</i> | <i>proteamaculans</i> | n.d. | 206.2 |
| <i>Staphylococcus</i> | <i>xilosus</i> o <i>saprofiticus</i> | n.d. | n.d. |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>mesenteroides</i> | 261.6 | n.d. |
| <i>Lactococcus</i> | <i>garviae</i> | 261.8 | 206.1 |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>lactis</i> | 261.6 | n.d. |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>citreum</i> | 261.6 | n.d. |
| <i>Enterococcus</i> | <i>gilvus</i> | 261.3 | 206.3 |

Tabella 46: numero di paia di basi di ciascun ceppo puro ottenuti con le coppie *primers f-HEX* e *g*.

Infine in figura 99 possiamo vedere, a titolo di esempio, la sovrapposizione dei profili V3 ottenuti dall'analisi delle comunità corrispondenti agli *step* produttivi del caseificio di Carcoforo ai profili di alcuni dei ceppi puri isolati. Da tale sovrapposizione possiamo osservare come, nonostante i profili dati dal DNA totale in V3 siano quelli con un maggior numero di picchi, tuttavia, la comigrazione dei ceppi puri al di sotto di essi fa sì che la loro attribuzione non possa essere univoca e, dunque, per un'identificazione sicura delle specie presenti nel campione dobbiamo sempre riferirci ai risultati degli isolamenti.



Fi

gura 93: profili delle comunità dal latte al formaggio ottenuti in regione V2 con il fluoroforo hex nei tre caseifici.

Dall'alto al basso: Carcoforo, Cannello e Mera.

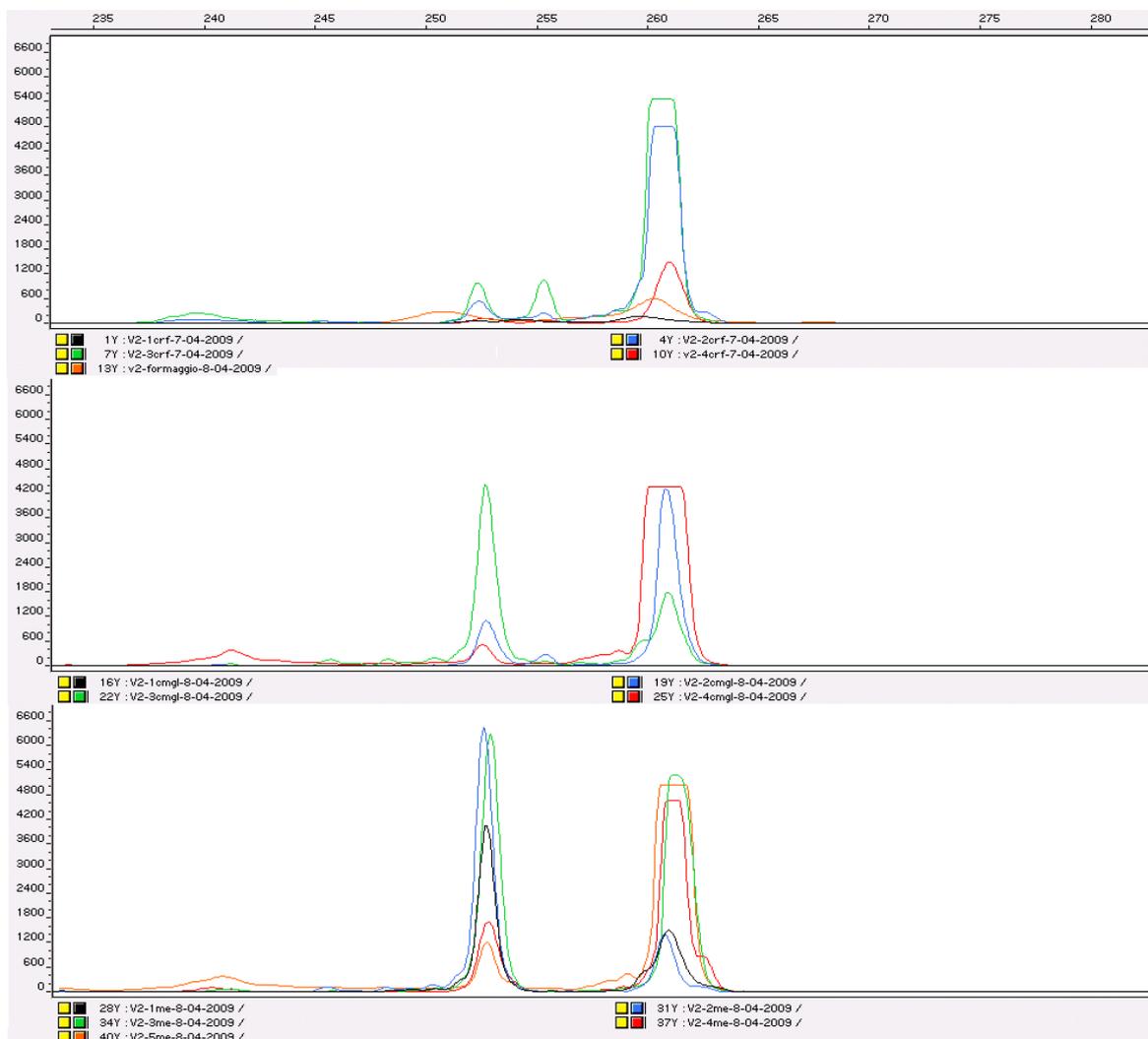


Figura 94: profili delle comunità dal latte al formaggio ottenuti in regione V2 con il fluoroforo ned nei tre caseifici. Dall'alto al basso: Carcoforo, Cangello e Mera.

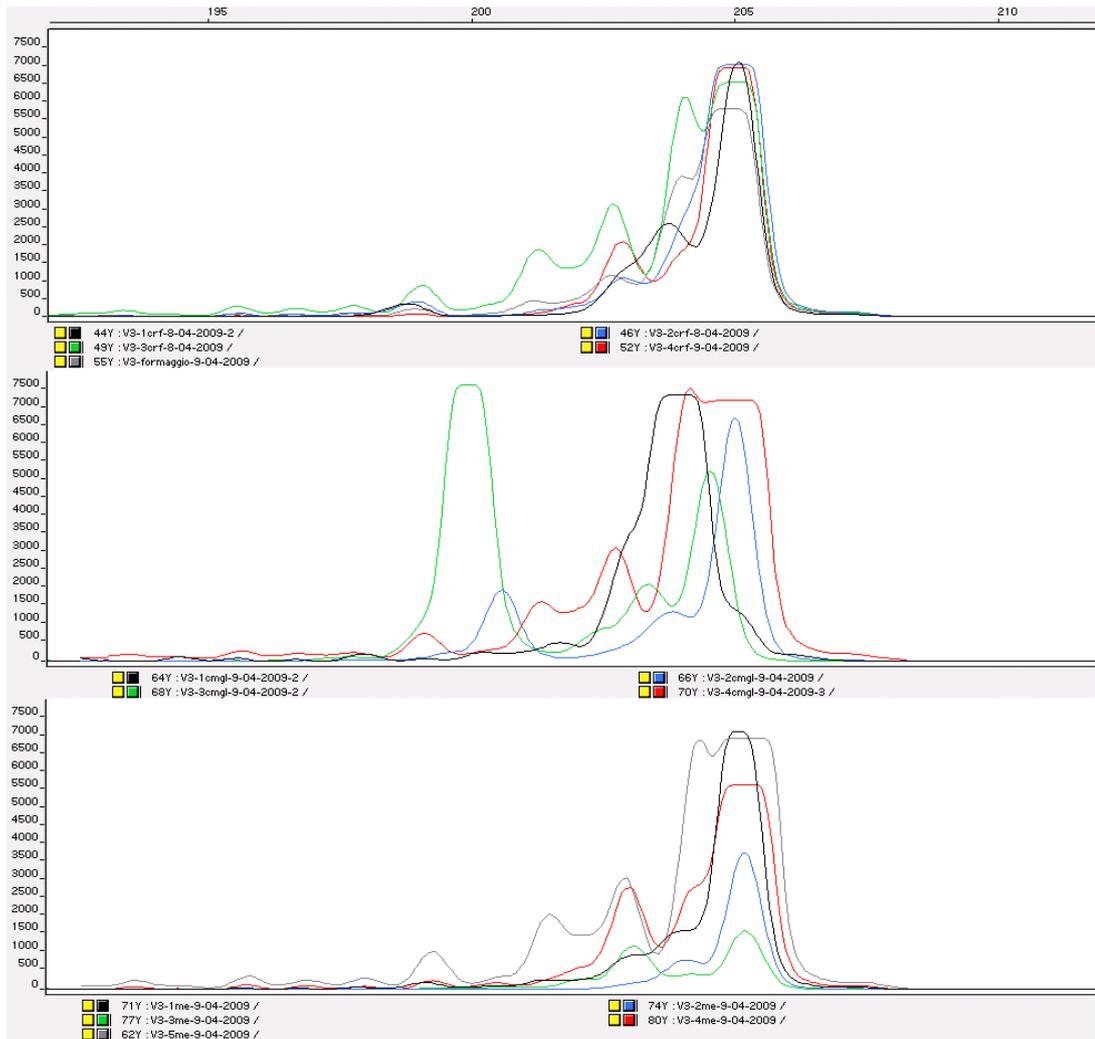


Figura 95: profili delle comunità dal latte al formaggio ottenuti in regione V3 nei tre caseifici. Dall'alto al basso: Carcoforo, Cangello e Mera.

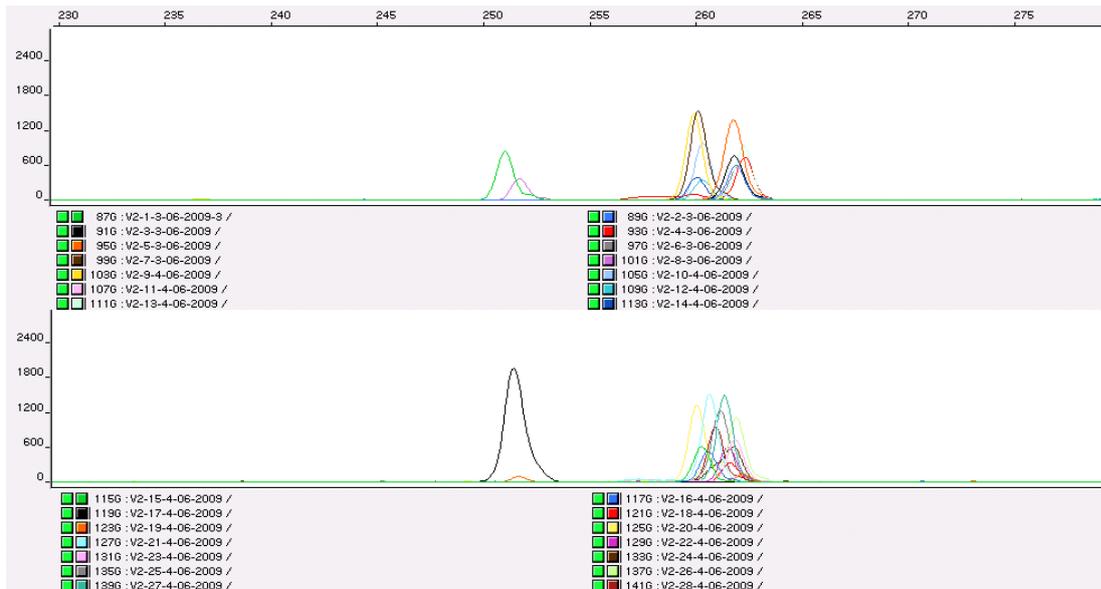


Figura 96: profili con i picchi dominanti dei ceppi puri isolati ottenuti in regione V2 con il fluoroforo hex.

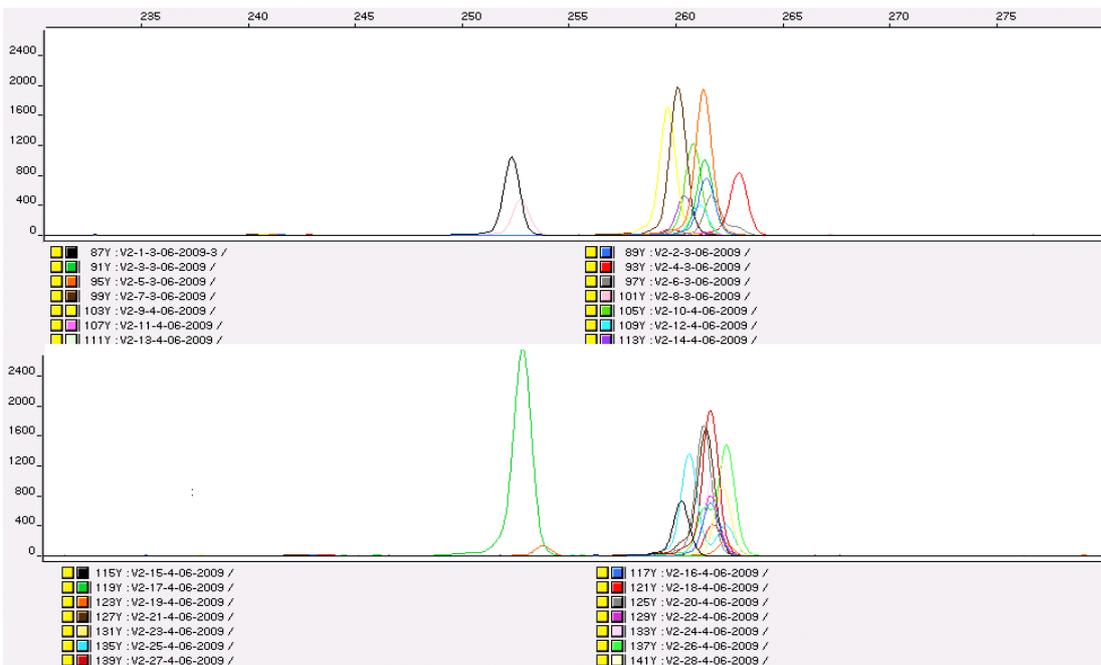


Figura 97: profili con i picchi dominanti dei ceppi puri isolati ottenuti in regione V2 con il fluoroforo ned.

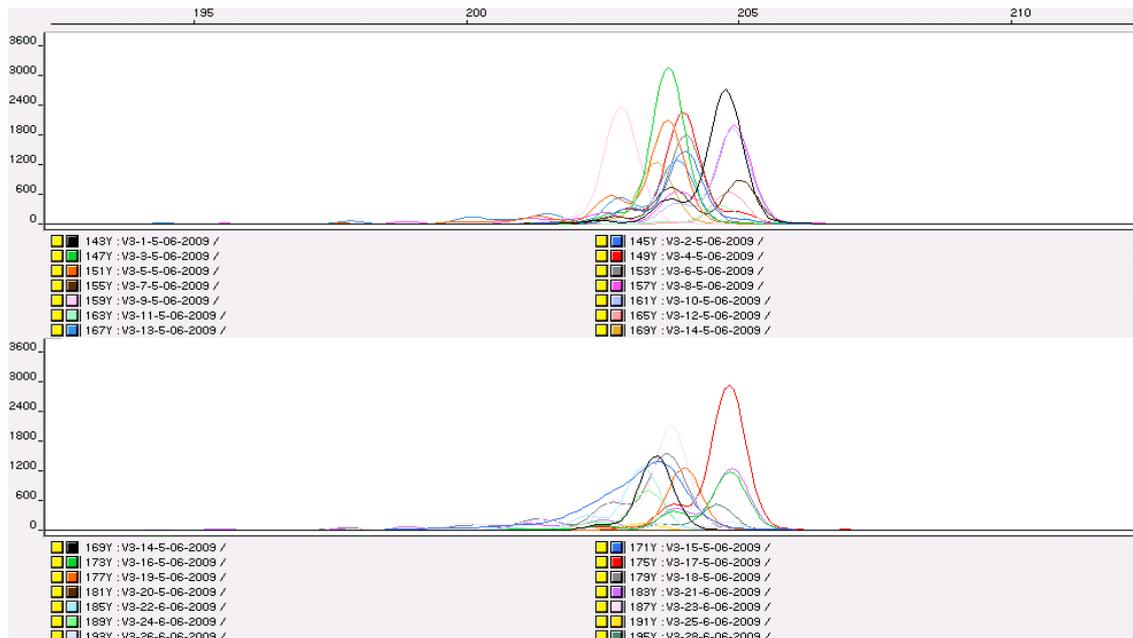


Figura 98: profili con i picchi dominanti dei ceppi puri isolati ottenuti in regione V3.

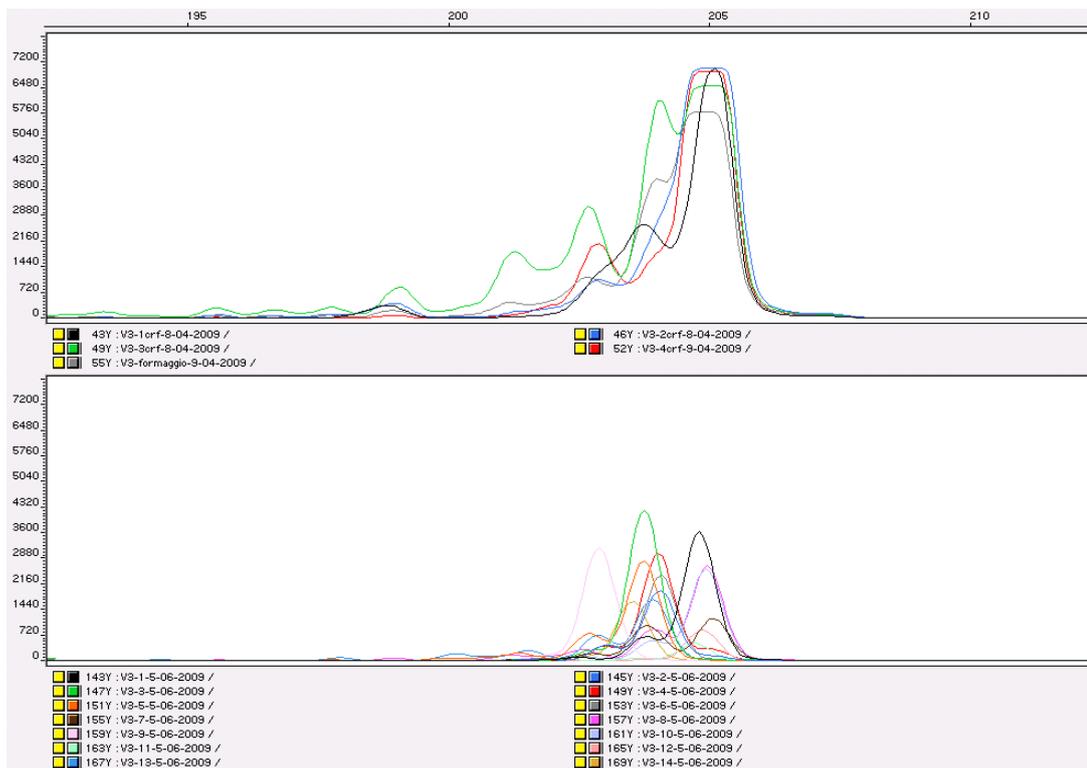


Figura 99: sovrapposizione dei profili V3 ottenuti dall'analisi delle comunità corrispondenti agli step produttivi del caseificio di Carcoforo ai profili di alcuni dei ceppi puri isolati.

4.6.2 ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

I risultati ottenuti dall'utilizzo della tecnica LH-PCR hanno portato ad investigare nuove regioni genomiche che permettessero di ottenere maggiori informazioni a livello tassonomico e consentissero dunque di discriminare fra le specie presenti all'interno delle comunità. In

seguito a ricerca bibliografica (114 e 67) si è deciso di utilizzare la regione spaziatrice dell'operone ribosomale compresa fra il 16S ed il 23S. Una tecnica che studia tale regione è l'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) sviluppata da Fisher and Triplett. Anche questa è una metodica *culture-independent* basata sulla PCR che può essere utilizzata sia sulle comunità microbiche o DNA totale che sui ceppi puri. Il principio e l'obiettivo sono gli stessi dell'LH-PCR ovvero la costruzione di un *database* contenente il numero di paia di basi (bp) caratteristici di una specie o di un ceppo su cui poi effettuare per confronto e sovrapposizione con i profili ottenuti dalle comunità l'attribuzione dei picchi alle specie. Anche in questo caso il DNA totale o il DNA dei ceppi puri è stato amplificato con una coppia di *primers* fra i quali almeno uno è marcato con un fluoroforo che emette fluorescenza. Gli ampliconi fluorescenti sono caricati nel capillare elettroforetico che, grazie ad apposito software, traduce la fluorescenza detectata in elettroferogrammi.

La coppia di *primers* utilizzata e la regione da essi amplificata è rappresentata in tabella 47 e figura 100.

| Primer-fluoroforo | sequenza | Target |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| ITSF | ITSF (5'-GTCGTAACAAGGTAGCCGTA-3') | regione spaziatrice ribosomale |
| ITS Reub-HEX | ITSReub (5'-GCCAAGGCATCCACC-3') | regione spaziatrice ribosomale |

Tabella 47

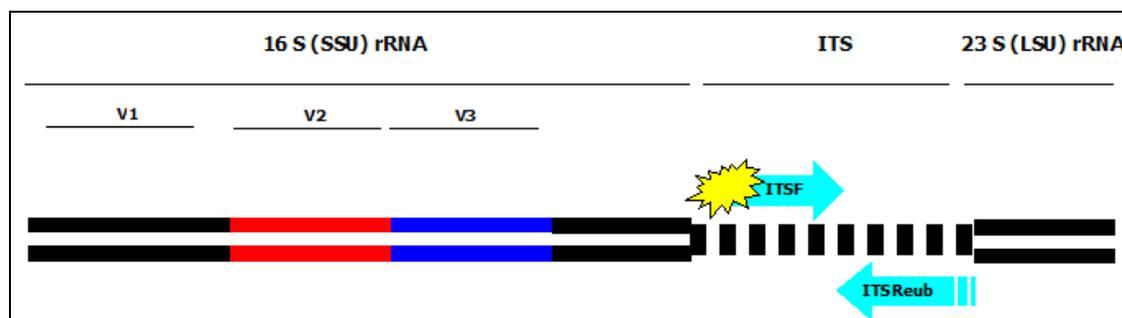


Figura 100: posizione della regione spaziatrice ITS ed attacco dei primers.

Dopo amplificazione di tutti i campioni e dei ceppi puri indicati in tabella 44 e 48 rispettivamente, i risultanti ampliconi fluorescenti sono stati caricati in condizioni denaturanti nel capillare elettroforetico per essere sottoposti a scansione. Dagli elettroferogrammi risultanti si è potuto osservare come la situazione si sia dimostrata totalmente differente rispetto a quella verificatasi in LH-PCR. Infatti con questa metodica è stato possibile costruire un *database* dei ceppi puri isolati dal momento che ciascun ceppo amplificato presentava uno o più picchi caratteristici ed i casi di comigrazione non si sono quasi mai verificati (v. tabella 48 e figura 101). Anche i profili ottenuti dalle comunità hanno presentato un numero di picchi molto più alto rispetto a quelli ottenuti in LH-PCR: ogni campione, infatti ha dato dai 14 ai 17 picchi

superiori alle 150 Unità di Fluorescenza. (In figura 102 sono rappresentati in sovrapposizione con colori differenti tutti i campioni provenienti da ciascun caseificio esaminato). Questo conferma il fatto che la metodica ARISA rileva le diversità tassonomiche evidenti dalla marcata variabilità esistente nella regione spaziatrice ribosomale all'interno del genoma batterico (62, 115 e 66) poiché essa esplora la diversità microbica a livello intraspecifico (116 e 117). In questo caso diversi picchi ottenuti dalle comunità sono stati identificati e l'attribuzione dei picchi ad una specie è stata univoca poiché la dimensione dei frammenti ottenuta dall'amplificazione della regione spaziatrice dei ceppi puri variava molto (fra 255 e 561 bp) e picchi comuni a differenti specie sono stati davvero rari e non hanno mai interessato quelli maggioritari. In Figura 103 è rappresentata, a titolo d'esempio, la sovrapposizione dei profili di alcuni ceppi puri ai tracciati ottenuti dall'analisi dei campioni provenienti dal caseificio di Mera.

| Specie | Codifica | Picchi (bp) |
|---|----------|---------------------|
| <i>Acinetobacter sp.</i> | S1 | 348;(322;310) |
| <i>Enterococcus casseliflavus F00186</i> | K | 222;252 |
| <i>Enterococcus durans</i> | I | 286;(319) |
| <i>Enterococcus faecalis PFK3</i> | G | 361;(324; 461) |
| <i>Enterococcus faecium RJ16 e C228</i> | Z ed S | 435;(525) |
| <i>Enterococcus faecium STP</i> | F | 600;(685) |
| <i>Enterococcus gilvus 2366</i> | M | 364;(310) |
| <i>E. faecalis NRIC 0113 e PFK3</i> | D | 321;(339;419) |
| <i>Kocuria rhizophila</i> | N2 | n.d. |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | E3 | 296;(274;518) |
| <i>Lactococcus garvie</i> | A | 605 |
| <i>Lactococcus lactis subps lactis</i> | Y1 | 574 |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | A4 | 325 |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | X3 | 642 |
| <i>Leuconostoc lactis/garlicum</i> | F3 | 520 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | N3 | 636 |
| <i>Microbacterium lacticum</i> | Z2 | 255 |
| <i>Pseudomonas synxantha</i> | G2 | 774;(319;798) |
| <i>Rothia sp.</i> | B2 | 673 |
| <i>Serratia proteamaculans o grimesii</i> | E2 | 334;(387) |
| <i>Staphylococcus aureus 185060</i> | 12 | 436;467;509;524;554 |
| <i>Staphylococcus aureus EHFS1</i> | 10 | 385 |
| <i>Staphylococcus equorum sp.</i> | 22 | 373;(461;561) |
| <i>Staphylococcus pasteurii 5N-3</i> | 11 | 465; 428; 511 |
| <i>Staphylococcus xilosus</i> | J3 | 445;(510;577) |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | W2 | 371 |

Tabella 48: Database contenente il numero in paia di basi (bp) caratteristico di ciascuna specie batterica. In parentesi sono indicati i picchi secondari.

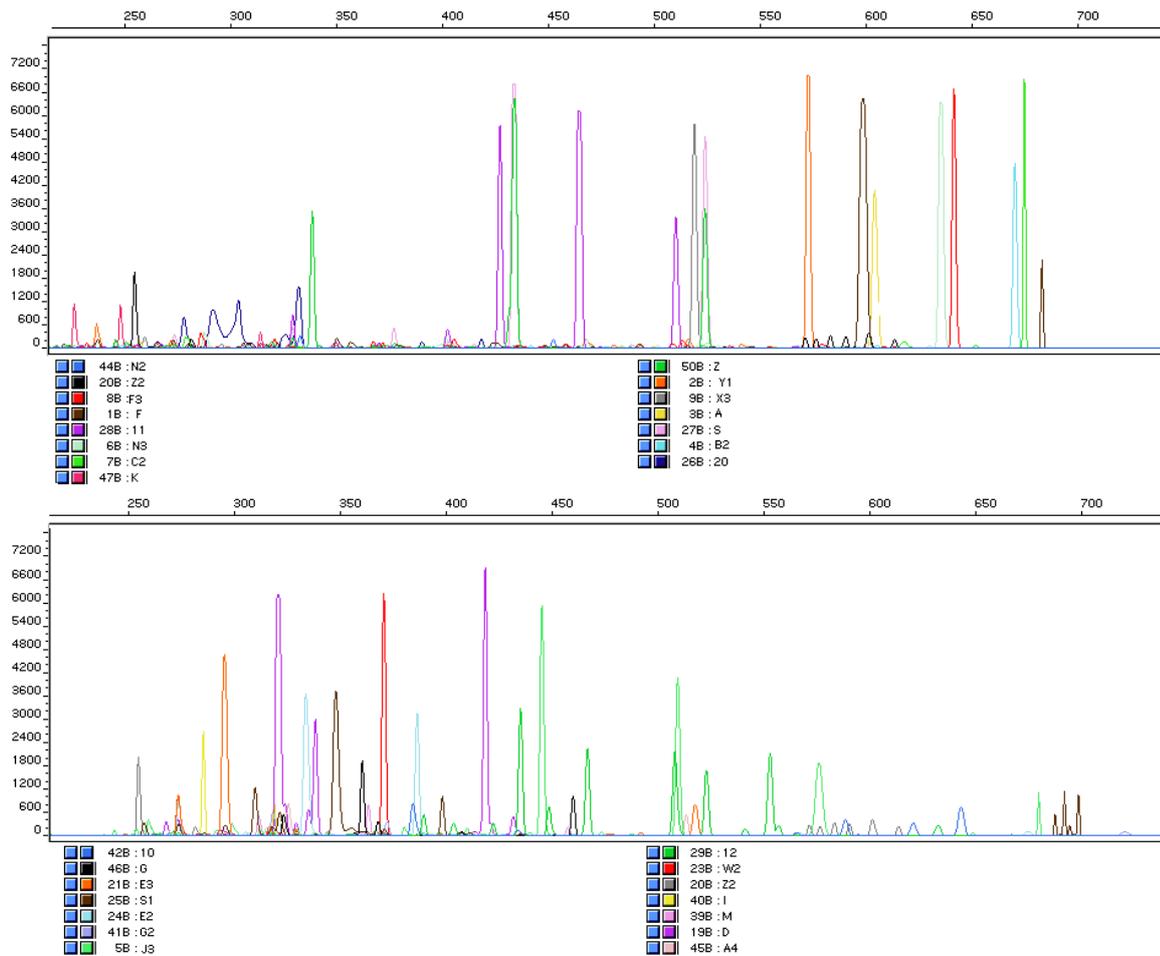


Figura 101: profili elettroforetici ottenuti dalla corsa dei ceppi puri isolati.

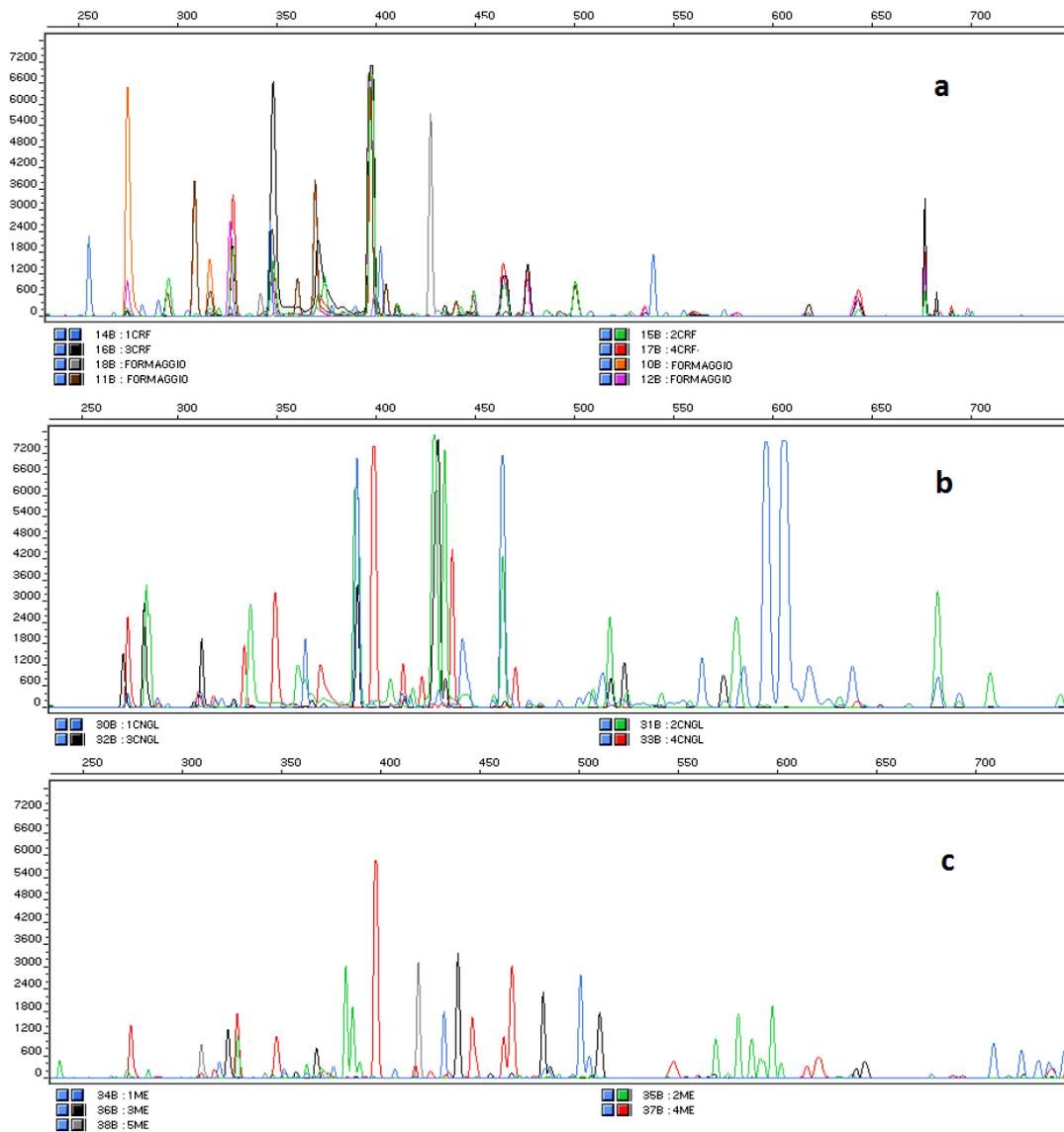


Figura 102: Profili elettroforetici ottenuti dalla corsa dei campioni corrispondenti a tutti gli step produttivi sovrapposti in un unico grafico dei caseifici di Carcoforo (a), Cangelo (b) e Mera (c) rispettivamente. Per le codifiche dei campioni riferirsi alla tabella 48.

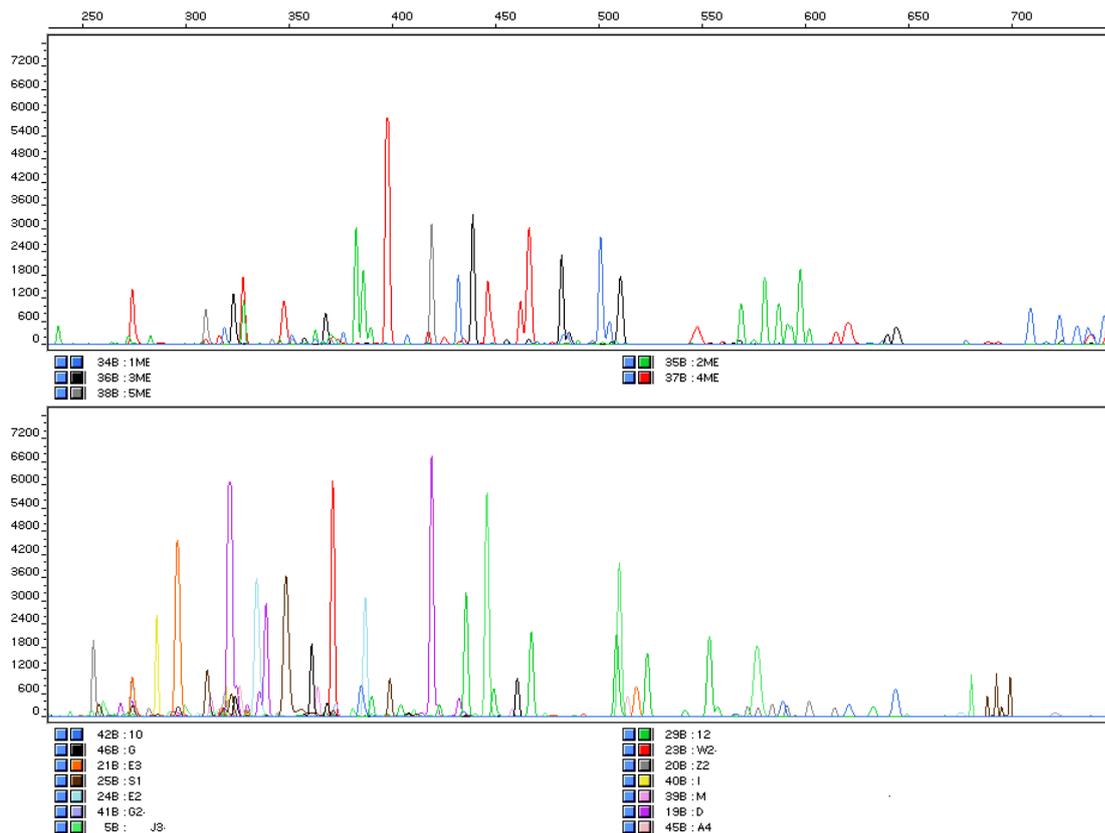


Figura 103: esempio di sovrapposizione dei profili delle comunità microbiche corrispondenti ai campioni del caseificio di Mera (parte superiore) ai profili dei ceppi puri isolati (parte inferiore) al fine di dare un'attribuzione putativa ai picchi delle comunità.

In riferimento agli elettroferogrammi delle comunità ottenuti in ciascun caseificio e riportati in figura 102 possiamo osservare come i profili delle tre realtà produttive risultino evidentemente diversi. Il numero di picchi per ciascun campione varia durante il processo produttivo e, campioni corrispondenti ma provenienti da caseifici diversi, hanno un numero di picchi differente ma, in linea di massima, paragonabile.

Per quanto riguarda il caseificio di Carcoforo nel campione di latte (1crf) osserviamo 14 picchi, nella cagliata (2crf) 15 picchi, nel formaggio dopo stufatura ovvero “3crf” (unico caseificio in cui è presente tale operazione) osserviamo una diminuzione del numero di picchi a 12, fatto evidentemente imputabile al riscaldamento del substrato. Ancora 12 picchi ritroviamo nel formaggio dopo salamoia (4crf) e nel formaggio finito di 40 gg (formaggio).

Nel caseificio di Cangelo osserviamo nel latte (1cngl) 14 picchi, nella cagliata (2cngl) 17 picchi, nel formaggio dopo salamoia (3cngl) 9 picchi, nel formaggio finito di 40gg (4cngl) 12 picchi.

Infine nei campioni del caseificio di Alpe Mera osserviamo nel latte (1Me) 16 picchi, nella cagliata (2Me) 17 picchi, nel formaggio di 48h (3Me) 13 picchi, di 15 gg (4Me) 16 picchi e 2 mesi (5Me) 7 picchi.

Dunque il numero di picchi ritrovati nel latte dei 3 caseifici è uguale eccetto che per Mera che presenta due picchi in più; il numero di picchi della cagliata è uguale in Cangelo ed in Mera mentre in Carcoforo ne troviamo due in meno; nel formaggio dopo salamoia abbiamo numeri di picchi paragonabili fra i caseifici di Carcoforo e Mera mentre tale numero risulta essere inferiore di 3-4 unità in Cangelo: ciò è probabilmente attribuibile al fatto che la salamoia di Cangelo era preparata *ex novo* e dunque meno ricca in microrganismi e che la concentrazione salina abbia determinato la riduzione dei microrganismi presenti nelle fasi precedenti. Infine per quanto riguarda i campioni di formaggio finito nei tre caseifici abbiamo lo stesso numero di picchi (12) in Carcoforo ed in Cangelo mentre un numero drasticamente inferiore (7) in Mera. E' da notare tuttavia che tale formaggio risulta essere di 20 gg più stagionato rispetto a quello dei due caseifici precedenti ed è verosimile che i microrganismi presenti in minori quantità abbiano lasciato il posto a microrganismi dominanti presenti nel prodotto finito che si concentrano dunque in un numero di picchi inferiore.

Nelle figure 105- 106 sono riportati i tracciati elettroforetici relativi ai campioni dei caseifici di Carcoforo, Cangelo ed Alpe Mera rispettivamente. In ciascun elettroferogramma i numeri indicano le specie microbiche cui sono stati attribuiti i picchi nei profili delle comunità. Tale operazione è stata effettuata, come precedentemente spiegato, in seguito a sovrapposizione dei tracciati delle comunità ai profili dei microrganismi puri isolati. Per semplicità nella tabella 49 sono decodificati i numeri corrispondenti alle specie microbiche sui tracciati elettroforetici.

| Genere e specie | |
|---|-----------|
| <i>Microbacterium lacticum</i> | 1 |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | 2 |
| <i>Acinetobacter sp.</i> | 3 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 4 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 5 |
| <i>Staphylococcus pasteurii</i> | 6 |
| <i>Enterococcus durans</i> | 7 |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | 8 |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | 9 |
| <i>Staphylococcus xilosus</i> | 10 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | 11 |
| <i>Lactococcus garvie</i> | 12 |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | 13 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 14 |

Tabella 49: codifiche dei picchi identificati negli elettroferogrammi

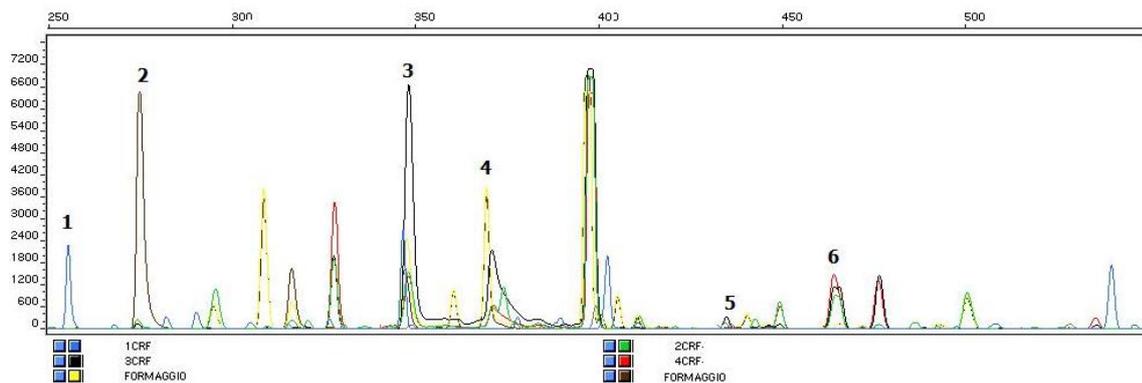


Figura 104: profili dei campioni ottenuti dai diversi step produttivi nel caseificio di Carcoforo. I numeri rappresentano le codifiche delle specie batteriche cui sono stati attribuiti i picchi e sono esposti nel testo.

Per quanto riguarda la realtà di Carcoforo: il picco **1** nel latte corrisponderebbe a *Microbacterium lacticum*, dato peraltro confermato dagli isolamenti. Il picco **2** comune alla cagliata, al formaggio dopo stufatura e dopo salamoia ma soprattutto al formaggio (dove è stato più volte isolato) è stato attribuito a *Lactobacillus paraplantarum*. Il picco **3** detectato in cagliata, formaggio dopo stufatura, dopo salamoia e formaggio finito corrisponde ad *Acinetobacter* sp. che era stato isolato in cagliata e nel formaggio dopo stufatura cui corrispondono i picchi più alti in ARISA. Il picco **4** presente in cagliata, formaggio dopo stufatura e dopo salamoia e formaggio è stato attribuito a *Streptococcus thermophilus*. Tale microorganismo era stato isolato soltanto dai campioni di formaggio. Il picco **5** corrisponderebbe ad *Enterococcus faecium* ed è stato trovato nei campioni di cagliata e nel formaggio dopo stufatura dato confermato dall'isolamento di tale specie nel secondo campione. Il picco **6** è presumibilmente attribuibile a *Staphylococcus pasteurii* ed è comune a cagliata, formaggio dopo stufatura e dopo salamoia cui corrisponde peraltro il picco più alto. Tale dato è confermato dall'isolamento di tale specie nel campione di formaggio dopo salatura fase in cui è attendibile un aumento delle micrococcaceae.

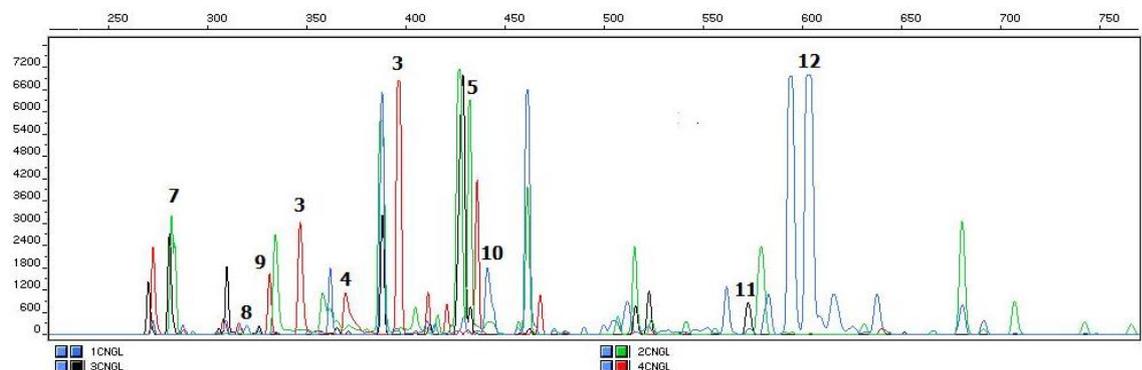


Figura 105: profili dei campioni ottenuti dai diversi step produttivi nel caseificio di Cangelo. I numeri rappresentano le codifiche delle specie batteriche cui sono stati attribuiti i picchi e sono esposti nel testo.

Le attribuzioni relative al caseificio di Cangelo sono riportate in figura 105. I due picchi indicati con il numero **3** a 348 e 322 bp (rispettivamente picco principale e secondario prodotti da tale microorganismo) sono attribuibili ancora ad *Acinetobacter* sp. e sono stati ritrovati nel

formaggio finito. Tuttavia tale microrganismo era stato isolato nella cagliata ma non nel formaggio ciò è presumibilmente attribuibile alla difficoltà di isolare in piastra colonie minoritarie. Il picco **4** corrisponde a *Streptococcus thermophilus* ed è stato ritrovato ancora una volta nel formaggio finito sebbene tale microrganismo non sia stato isolato sui terreni colturali. Il picco **5** è stato attribuito ad *Enterococcus faecium* ed è stato ritrovato nella cagliata e nel formaggio dopo salamoia: tale microrganismo era anche stato isolato nel latte e poi nel formaggio dopo salatura dunque è giustificata la sua presenza anche nel campione intermedio fra queste due fasi. Il picco **7** appartenente alla cagliata è attribuibile ad *Enterococcus durans*: tale specie microbica è stata isolata più volte nel latte e nelle fasi successive del processo produttivo dunque è verosimile che sia presente anche in tale fase immediatamente successiva all'aggiunta di caglio al latte. Il picco **8** presente con bassa fluorescenza e solo nel latte è attribuibile a *Leuconostoc citreum* ma non è stato isolato in tale campione con i metodi tradizionali. Il picco **9** è attribuibile a *Staphylococcus simulans* ed è stato ritrovato nel formaggio finito tuttavia non è stato isolato nel campione corrispondente. Il picco **10** sarebbe generato da *Staphylococcus xilosus* ed è presente nel latte e nella cagliata ma non è mai stato isolato in questi campioni. Il picco **11** è generato da *Lactococcus lactis* che è visibile nel formaggio dopo salamoia e da solo un debole picco nel latte. Tale specie microbica è stata isolata in entrambi i campioni. Infine il picco **12** apparterebbe a *Lactococcus garvie* e questo è stato una delle specie più frequentemente isolate nel campione corrispondente. .

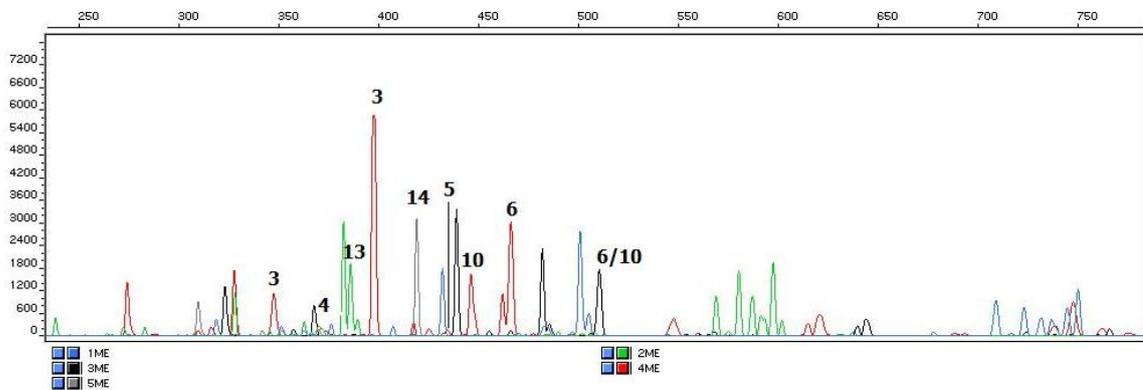


Figura 106: profili dei campioni ottenuti dai diversi step produttivi nel caseificio di Alpe Mera. I numeri rappresentano le codifiche delle specie batteriche cui sono stati attribuiti i picchi e sono esposti nel testo.

Per quanto riguarda la realtà di Mera (figura 106): i picchi **3** corrispondono ancora al picco principale e secondario di *Acinetobacter* sp.: entrambi i picchi sono stati rilevati nello stesso campione ovvero il formaggio di 15 gg a conferma dell'effettiva presenza di tale microrganismo. Benchè *Acinetobacter* sp. sia stato isolato nei campioni precedenti non è stato ritrovato in questo. Il picco **4** è attribuibile a *Streptococcus thermophilus* ed è stato ritrovato in cagliata e nel formaggio di 15 gg, dati non confermati dall'isolamento. Il picco **5** è stato attribuito ad *Enterococcus faecium* ed è stato ritrovato ancora nel formaggio di 15 gg: tale dato è confermato dall'isolamento del microrganismo nel campione corrispondente. Il picco **6** a

465 bp corrisponde al picco principale generato da *Staphylococcus pasteurii* nel formaggio di 15 gg e più debolmente nel formaggio di 48h. Tale dato non è confermato dagli isolamenti tuttavia la presenza del picco secondario a 510 bp di *Staphylococcus pasteurii* nel formaggio di 48h potrebbe confermare la presenza di tale specie quantomeno in quest'ultimo campione. E' tuttavia da notare che tale picco a 510 bp va a comigrare con il picco secondario di *Staphylococcus xilosus*: tale comigrazione è indicata come picco "6/10" appartenente sempre al formaggio di 48h nel quale *Staphylococcus xilosus* non era stato isolato. Il picco **10** a 445 bp ritrovato nel formaggio di 15gg corrisponde al picco principale di *Staphylococcus xilosus* che tuttavia in tale campione non è stato isolato. Il picco **13** presente nella cagliata corrisponderebbe a *Leuconostoc lactis*: tale microrganismo non è stato isolato in corrispondenza di tale campione ma nel latte (step immediatamente precedente). Infine solo nel formaggio finito (pari a 2 mesi) è presente un ascrivibile a *Enterococcus faecalis* (picco **14**). Tale specie microbica è stata una fra quelle più frequentemente isolate all'interno di tale campione ma anche nei formaggi meno stagionati.

Dopo l'analisi di tutti i campioni e l'identificazione putativa di tutti i picchi delle comunità è stato effettuato lo studio degli indici di diversità caratteristici di ciascuna popolazione microbica presente sui campioni in modo da poterle confrontare l'un l'altra. Si sono determinati dunque l'indice di Shannon-Weaver o di Diversità ($S = -\sum P_i * \log_2 P_i$) e l'indice di Equitabilità ($E = H / \log_2 S$) mentre la possibilità di una valutazione della ricchezza è offerta dal conto dei numeri dei picchi ottenuti per ciascuna comunità. Tutti tali risultati sono riassunti nella tabella 50.

| | 1crf | 2 crf | 3 crf | 4 crf | Form aggi o | 1Cng l | 2 Cngl | 3 Cngl | 4 Cngl | 1 Me | 2 Me | 3 Me | 4 Me | 5 Me |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> | | | | | | | | | | | | | | <u>61</u> |
| <i>Acinetobacter sp.</i> | | <u>8.9</u> | <u>21.8</u> | 6.3 | 6.4 | | | | 13.3 | | | | 6.1 | |
| <i>Rothia</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Lactococcus lactis</i> | | | | | | | | 5.1 | | | | | | |
| <i>Enterococcus faecium</i> | | | <u>0.7</u> | | | | 10.8 | 2.8 | | | | | 1 | |
| <i>Enterococcus gilvus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterococcus casseliflavus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterococcus durans</i> | | | | | | | <u>3.3</u> | | | | | | | |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Lactococcus garvie</i> | | | | | | <u>22.2</u> | | | | | | | | |
| <i>Staphylococci equorum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococci lentus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Streptococcus parauberis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | | 3.2 | 15.8 | 2.7 | <u>11.2</u> | | | | 9.7 | | 0.7 | | 1.3 | |
| <i>Pseudomonas synxantha</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Kocuria rhizophila</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Microbacteriu lacticum</i> | 17.2 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Staphylococci xilosus</i> | | | | | | 5.7 | 1.4 | | | | | | 8.4 | |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | | 1 | | 4.2 | <u>21.2</u> | | | | | | | | | |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | | | | | | | | | | | 12 | | | |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | | | | | | 0.8 | | | | | | | | |
| <i>Staphylococci pasteurii</i> | | 5.7 | 2.8 | <u>8.3</u> | | | | | | | | 1 | 15.3 | |
| <i>Staphylococci simulans</i> | | | | | | | | | 4.7 | | | | | |
| <i>Staphylococci aureus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Aree identificate | 17.2 | 18.8 | 41.1 | 21.5 | 38.8 | 27.9 | 15.5 | 7.9 | 27.7 | 0 | 12.7 | 1 | 32.1 | 61 |
| Aree non identificate | 82.8 | 81.2 | 58.9 | 78.5 | 61.2 | 72.1 | 84.5 | 92.1 | 72.3 | 100 | 87.3 | 99 | 67.9 | 39 |
| Numero di picchi della comunità | 14 | 15 | 12 | 12 | 12 | 14 | 17 | 9 | 12 | 16 | 17 | 13 | 16 | 7 |
| Shannon index | 2.11 | 2.13 | 3.06 | 2.83 | 3.06 | 3.42 | 3.91 | 2.67 | 3.03 | 3.65 | 3.7 | 2.99 | 3.38 | 1.73 |
| Max Shannon index | 3.81 | 3.91 | 3.58 | 3.58 | 3.58 | 3.81 | 4.09 | 3.17 | 3.58 | 4.00 | 4.09 | 3.70 | 4.00 | 2.81 |
| Indice di equitabilità | 0.55 | 0.55 | 0.85 | 0.79 | 0.85 | 0.90 | 0.96 | 0.84 | 0.85 | 0.91 | 0.91 | 0.81 | 0.85 | 0.62 |

Tabella 50: attribuzione dei picchi all'interno delle comunità nei campioni dei tre caseifici e studio della diversità microbica con i valori assunti dai diversi indici.

Nella tabella sono indicate in rosso tutte le specie identificate con la tecnica ARISA. I numeri indicati al di sotto di ciascun campione rappresentano le percentuali dell'area attribuita allo specifico microorganismo rispetto all'area totale. I numeri sono sottolineati quando il microorganismo cui il picco è riferito è stato anche isolato nel campione corrispondente. Sul fondo della tabella sono indicate le percentuali delle aree elettroforetiche identificate, quelle delle non identificate, il numero di picchi dectati in ciascun campione nonché gli indici di diversità microbica.

Tuttavia l'indice di diversità microbica adatto ad effettuare un confronto fra popolazioni aventi anche un numero di specie ma soprattutto picchi differenti è quello di Equitabilità.

Come si può notare, purtroppo, per alcuni campioni quali il latte di Mera ed il formaggio di 48 h la percentuale di area "riconosciuta" è stata nulla o pari all'uno per cento. Per il formaggio di 2 mesi di Mera invece è stata molto alta (61%) tuttavia essa è totalmente ascrivibile ad una sola specie (*Enterococcus faecalis*), inoltre tale campione presenta il più basso numero di picchi (7). Le percentuali di aree riconosciute più elevate le troviamo nel formaggio dopo stufatura e nel formaggio finito di Carcoforo (41.1 e 38.8 rispettivamente) a fronte di indici di equitabilità e dunque di diversità all'interno delle comunità relativamente elevate (entrambi 0.85).

Dal punto di vista della diversità fra campioni simili appartenenti a diversi caseifici notiamo come il latte e la cagliata di Carcoforo siano quelli che presentano la minore diversità (entrambi

0,55) rispetto agli analoghi di Canello (0.90 e 0.96) e Mera (0.91 per entrambi). Gli indici di Equitabilità dei formaggi dopo salamoia sono relativamente vicini in tutti e tre i caseifici: 0.79 per Carcoforo, 0.84 per Canello e 0.81 per Mera.

Infine per quanto riguarda i formaggi di Carcoforo e del Canello questi dopo 40 gg di maturazione presentano uguali indici di equitabilità (0.85). Il formaggio di 15 gg di Mera ha lo stesso indice di equitabilità dei due precedenti mentre quello di 2 mesi subisce un abbassamento di tale valore che si attesta a 0.62 verosimilmente poiché durante la maturazione rimane un numero inferiore di specie che sono dominanti all'interno del substrato.

4.6.3 SSCP ANALYSIS (Single Strand Conformation Polymorphism analysis)

Le comunità microbiche presenti sui formaggi sono state studiate anche con un'altra metodica ovvero la SSCP analysis (Single Strand Conformation Polymorphism analysis). L'applicazione di questa tecnica è stata effettuata in Francia presso il Laboratoire de Recherches Fromagères dell'INRA (Institute Nationale pour la Recherche Agronomique). Questa metodica è basata anch'essa, come le due precedenti, sull'amplificazione di frazioni di DNA variabili con *primers* marcati con fluorofori. Dopo separazione degli ampliconi fluorescenti attraverso un capillare elettroforetico (ABI Prism 310 Genetic Analyzer) quello che si ottiene è ancora un elettroferogramma. Tuttavia, in questo caso, i campioni, anziché correre in condizioni denaturanti (filamento di DNA singolo e disavvolto come avveniva in l'LH-PCR o in ARISA) corre in condizioni non denaturanti. Infatti il genoma corre "rinaturato" ovvero il filamento, dopo essere stato separato, si ripiega assumendo una conformazione α , più specificamente, una struttura secondaria che dipende dalla sequenza delle basi azotate che lo compongono. In questo caso dunque i campioni non saranno più separati sulla base di un'eterogeneità di lunghezza nella regione genomica amplificata ma sulla base delle variazioni di sequenza; il risultato non sarà più un numero di paia di basi (bp) ma un tempo di eluizione o *data point*.

I *primers* utilizzati e le regioni amplificate sono quelle illustrate nella sezione relativa all'LH-PCR ovvero quelli che amplificano la regione V2 e la regione V3 separatamente come illustrato in tabella 43 e figura 92 (75).

Anche in questo caso si sono costruiti tre *database* di riferimento contenenti i *data point* dei ceppi puri (vedi tabella 17). Ciascun *database* contiene i risultati ottenuti dall'analisi elettroforetica degli ampliconi della regione V2 con i coloranti HEX e NED e della regione V3 con il colorante NED riportati nelle tabelle 52-54 rispettivamente.

| V2 | HEX |
|--------------------------------|---------------------------|
| <i>Microbacterium lacticum</i> | 6950.26; 7324.92; 7377.41 |
| <i>E. casseliflavus</i> | 7040 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 7150; 7331 |
| <i>St. aureus</i> | 7427;7170 |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | 7222; 7348 |
| <i>L. paraplantarum</i> | 7233; 7338 |
| <i>E. gilvus</i> | 7277;7288 |
| <i>Rothia</i> | 7283 |
| <i>E faecalis</i> | 7304.42 |
| <i>E .faecalis / E. coli</i> | 7306 ;7308. 79 |
| <i>E. casseliflavus</i> | 7307.64 |
| <i>Pseudomonas synxantha</i> | 7335.9; 7317.13 |
| <i>E. faecium /</i> | / 7337 / |
| <i>St. xilosus/</i> | 73.47.32;7489.93 |
| <i>Kocuria</i> | 7349,31 |
| <i>E. durans</i> | 7361;7391; 7440.77 |
| <i>Leuc. lactis</i> | 7363.36 |
| <i>L. lactis</i> | 7366.48 |
| <i>St. pasteuri</i> | 7367,57;7416 |
| <i>L. garviae</i> | 7381.6 |
| <i>Acinetobacter</i> | 7382 |
| <i>Str. thermophilus</i> | 7387 |
| <i>St. simulans</i> | 7390 |
| <i>Str . parauberis</i> | 7406.91 |
| <i>E. gallinarum</i> | 7405 |
| <i>Leuc. mesenteroides</i> | 7444.6 |
| <i>Staph. equorum</i> | 7460.47 |

Tabella 52:database dei ceppi puri in regione V2 con fluoroforo hex.

| V2 | NED |
|--------------------------------|----------------|
| <i>E. gilvus</i> | 6901.49 |
| <i>Microbacterium lacticum</i> | 6949.32 |
| <i>Rothia</i> | 6982 |
| <i>E. faecium</i> | 6997.6 |
| <i>Pseudomonas sunxantha</i> | 6998.54 |
| <i>E. durans</i> | 7087. 17; 7141 |
| <i>E. gallinarum</i> | 7030 |
| <i>Pseudomonas sunxantha</i> | 7030.53 |
| <i>E. faecalis</i> | 7039.7 |
| <i>E faecalis PFK3</i> | 7039.6 ; 7247 |
| <i>E. casseliflavus</i> | 7039.7; 7246.9 |
| <i>E. coli</i> | 7067.69 |

| | |
|------------------------------------|-----------------|
| <i>St. pasteuri</i> | 7091.69 |
| <i>L. garviae</i> | 7087.17 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 7140.83 |
| <i>St. simulans</i> | 7140 |
| <i>Ped. Pentosaceus</i> | 7150.5; 7193,11 |
| <i>St. aureus</i> | 7171 |
| <i>St. equorum</i> | 7175.39 |
| <i>St. xilosus</i> | 7180;7219 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 7217.68 |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | 7223.25 |
| <i>Kocuria rizophyla</i> | 7225.59 |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | 7232.16 |
| <i>Streptococcus parauberis</i> | 7241 |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | 7246.17 |
| <i>L. lactis</i> | 7248.91 |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | 7326.11 |

Tabella 53:database dei ceppi puri in regione V2 con fluoroforo ned.

| V3 | NED |
|------------------------------------|---------|
| <i>Rothia</i> | 6322.44 |
| <i>E. casseliflavus</i> | 6623.3 |
| <i>E. faecalis PFK3</i> | 6623 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | 6724.22 |
| <i>E. coli</i> | 6637 |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | 6653.04 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6671.73 |
| <i>Staphylococcus pasteuri</i> | 6672.25 |
| <i>E.faecium STP</i> | 6687.54 |
| <i>E.faecalis</i> | 6689.33 |
| <i>E. gilvus</i> | 6699.35 |
| <i>E. gallinarum</i> | 6696.57 |
| <i>E. durans</i> | 6695 |
| <i>Staphylococcus equorum</i> | 6711.79 |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | 6719.85 |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | 6743,16 |
| <i>Acinetobacter</i> | 6740.54 |
| <i>Lactobacillus paraplantarum</i> | 6758 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 6763.13 |
| <i>Pseudomonas synxantha</i> | 6795.88 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 6797.21 |

| | |
|---------------------------------|---------|
| <i>Lactococcus lactis</i> | 6808.43 |
| <i>Serratia proteamaculans</i> | 6811,52 |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | 6811.45 |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | 6811.31 |
| <i>Kocuria</i> | 6811.04 |
| <i>Lactococcus garviae</i> | 6814.6 |
| <i>Microbacterium lacticum</i> | 6818.63 |
| <i>Streptococcus parauberis</i> | 6826.2 |

Tabella 54: database dei ceppi puri in regione V3 con fluoroforo ned.

Nelle figure 108-110 sono riportati i profili ottenuti dalle corse elettroforetiche dei ceppi puri nelle regioni V2 con i coloranti hex e ned e nella regione V3 con il solo colorante hex.

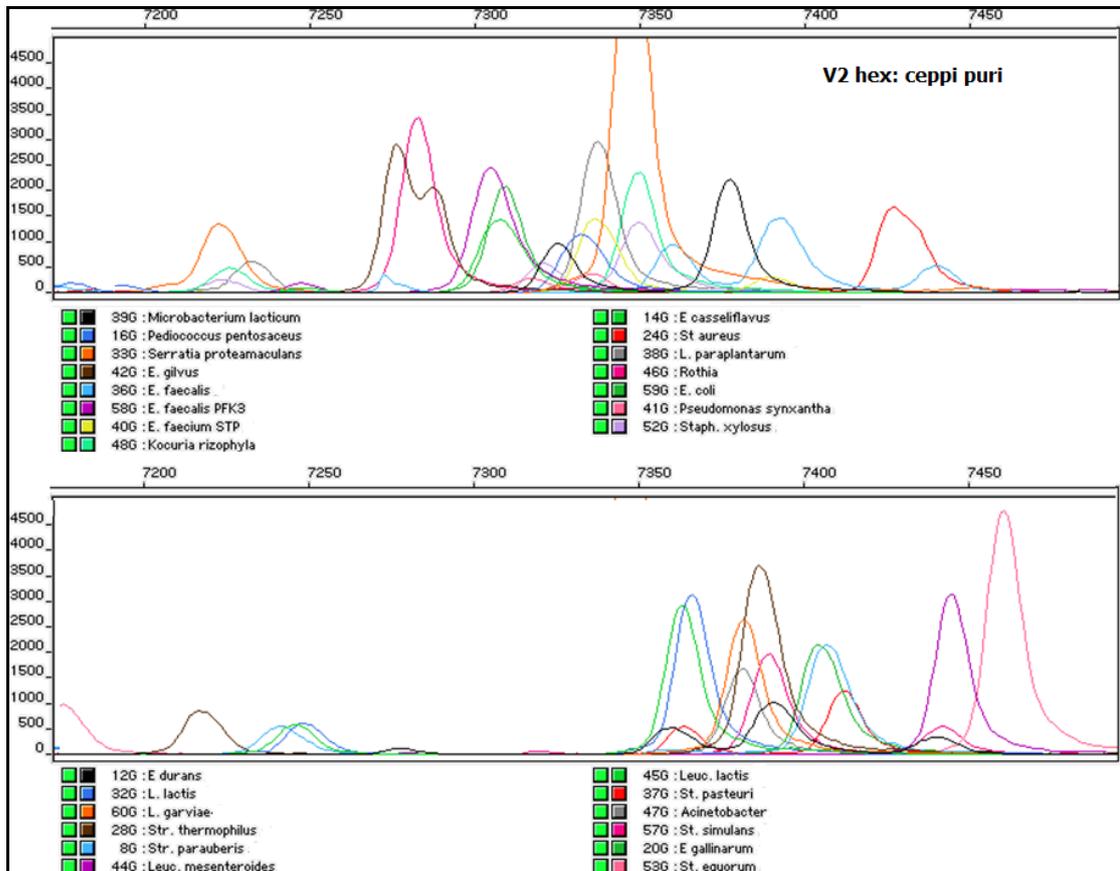


Figura 108: elettroferogrammi corrispondenti ai profili elettroforetici ottenuti dai ceppi isolati amplificati nella regione V2 con marcatura fluorescente hex.

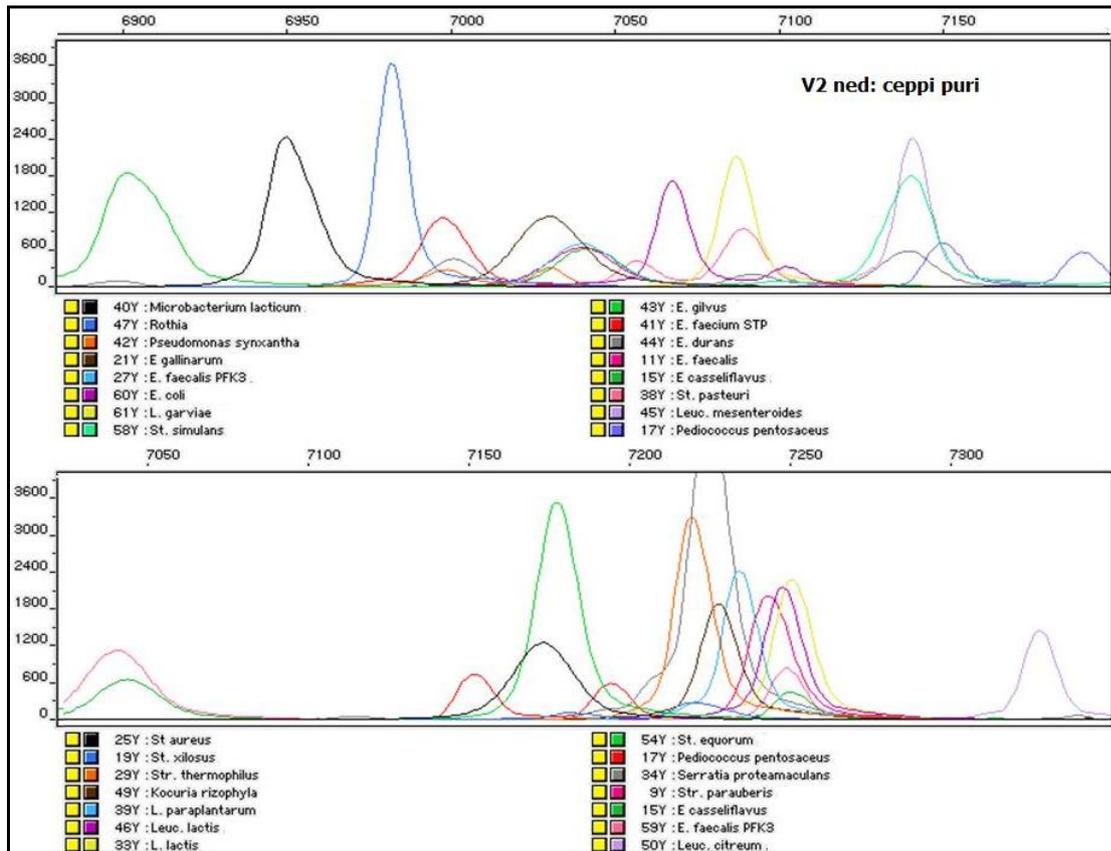


Figura 109: elettroferogrammi corrispondenti ai profili elettroforetici ottenuti dai ceppi isolati amplificati nella regione V2 con marcatura fluorescente ned.

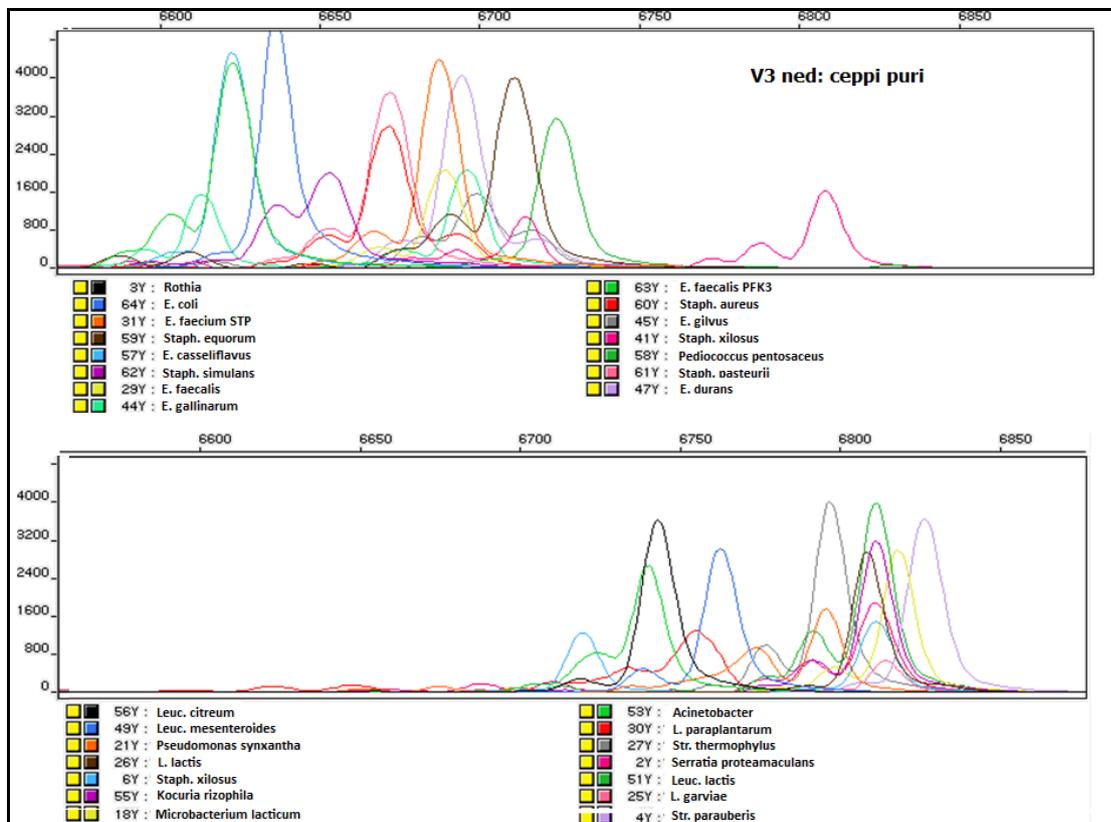


Figura 110: elettroferogrammi corrispondenti ai profili elettroforetici ottenuti dai ceppi isolati amplificati nella regione V3 con marcatura fluorescente ned.

Come si può notare dai profili anche in questo caso, come era successo con le analisi LH-PCR, i picchi ottenuti dai ceppi puri hanno mostrato diverse comigrazioni. Tuttavia, il fenomeno si è presentato molto meno marcato in SSCP che non in LH-PCR tant'è vero che, confermando i risultati sulla base degli isolamenti, si sono potuti identificare molti picchi presenti nelle comunità.

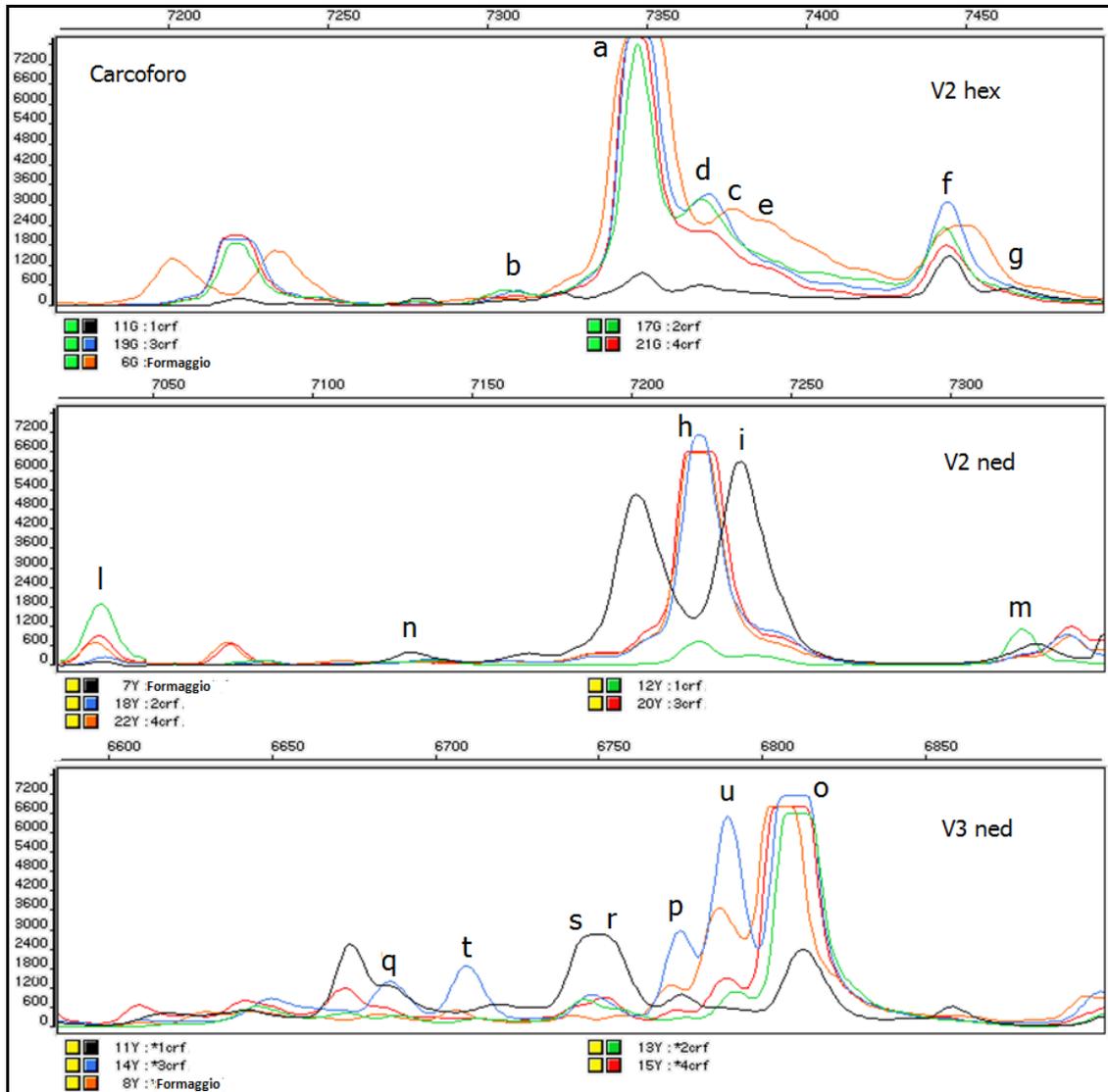


Figura 111: Profili di ciascuno step produttivo del caseificio di Carcoforo ottenuto nelle regioni V2 e V3 con i diversi coloranti e relativa identificazione dei picchi (discussa nel testo).

In particolare, per quanto riguarda il caseificio di Carcoforo, si veda la figura 111 dove è rappresentata l'attribuzione dei picchi detectati nei diversi profili effettuata mediante sovrapposizione dei profili dei ceppi puri isolati con quelli delle comunità.

Nello specifico, nella regione V2 con il colorante hex il picco **a** è stato attribuito a *Serratia proteamaculans*, *Kocuria rhizophila* e *Staphylococcus xilosus* che dopo sovrapposizione dei profili corrispondenti con quelli della comunità comigrerebbero in quella posizione. Tale picco è comune al latte, alla cagliata, al formaggio dopo stufatura, dopo salamoia ed al formaggio finito. In effetti *Serratia proteamaculans* era stata isolata nel formaggio finito ma non negli altri

campioni. *Kocuria rhizophila* era stata isolata solo nella cagliata mentre *Staphylococcus xilosus* era stata isolato solo nel latte. Il picco **b** è stato attribuito ad *Enterococcus casseliflavus* ed *Escherichia coli*. Tale picco è comune al latte, alla cagliata, al formaggio dopo stufatura e dopo salamoia, tuttavia tali microrganismi non sono mai stati isolati in nessuno dei campioni suddetti, verosimilmente poiché in quantità davvero minoritarie. Il picco **c**, detectato nel latte e nel formaggio finito, è stato attribuito a *Microbacterium lacticum*, *Lactococcus garvie* ed *Acinetobacter* sp.. *Microbacterium lacticum* era stato più volte isolato nel latte ma non nel formaggio mentre *Lactococcus garvie* in entrambi i campioni. Nessun isolamento su questi substrati invece per *Acinetobacter* sp.. Il picco **d** ritrovato nei profili del latte, cagliata, formaggio dopo stufatura e dopo salamoia apparterebbe a *Leuconostoc lactis* e *Lactococcus lactis*. Il secondo è stato isolato in tutti i campioni eccetto che nel formaggio dopo salamoia mentre *Leuconostoc lactis* solo nella cagliata. Il picco **e** è stato attribuito ad *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus simulans* e *Streptococcus thermophilus*. Tale picco appartiene a solo al formaggio tuttavia *Enterococcus durans* e *Staphylococcus simulans* non sono mai stati isolati in tale campione. Diverso è invece per *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus thermophilus* che sono stati ritrovati entrambi fra gli isolati del formaggio. Il picco **f** apparterebbe a *Leuconostoc mesenteroides* ed è presente in tutti i campioni dal latte al formaggio finito. Tale microrganismo, tuttavia, è stato isolato solo nel latte e nel formaggio finito ma possiamo supporre che fosse presente anche negli altri intermedi di produzione. Il picco **g** detectato solo nel latte è stato attribuito a *Staphylococcus equorum* ma non è mai stato ritrovato fra gli isolati di tale campione.

Sempre nella regione V2 con il colorante ned il picco **h** comune a tutti i campioni dal latte al formaggio finito è stato attribuito a *Kocuria rhizophila*, *Serratia proteamaculans* e *Streptococcus thermophilus*. Come già detto *Serratia proteamaculans* e *Streptococcus thermophilus* sono stati isolati solo nel formaggio mentre *Kocuria rhizophila* solo nella cagliata. Il picco **i** detectato nel formaggio è stato attribuito a *Lactobacillus paraplantarum* e *Streptococcus parauberis*, dei quali, il primo è stato effettivamente isolato nel formaggio mentre il secondo nella cagliata. Il picco **l** apparterebbe a *Rothia* sp. ed è presente nei profili di tutti i campioni sebbene questo sia stato isolato solo nel latte e nella cagliata e nel profilo del primo campione in effetti provoca il picco più alto. Il picco **m** appartiene a *Leuconostoc citreum* ed è stato ritrovato solo nel latte sebbene in tale campione non sia stato isolato. Infine il picco **n** è stato ritrovato in latte e cagliata ed apparterebbe a *Staphylococcus simulans* che, in effetti è stato isolato nella sola cagliata.

Infine nella regione V3 il picco **o** è stato attribuito a *Lactococcus garvie*, *Kocuria rhizophila*, *Leuconostoc lactis*, *Serratia proteamaculans* e *Staphylococcus xilosus* ed appartiene ai profili di tutti i campioni dal latte al formaggio finito. *Lactococcus garvie* era stato isolato nel latte, nella cagliata e nel formaggio finito. *Kocuria rhizophila* e *Leuconostoc lactis* solo nella cagliata,

Serratia proteamaculans solo nel formaggio ed infine *Staphylococcus xilosus* solo nel latte. Il picco **p** apparterebbe a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pasteurii* ed è comune al latte, alla cagliata ed al formaggio dopo salamoia e, in effetti, nell'ultimo campione sono stati isolati entrambi i microrganismi. Il picco **q** rilevato nei campioni di latte, cagliata, formaggio dopo stufatura e formaggio finito appartiene ad *Enterococcus faecium* che è stato isolato nel latte e nel formaggio dopo stufatura. Il picco **r** sarebbe determinato da *Lactobacillus paraplantarum* ed è presente solo nel latte e nel formaggio dopo salamoia tuttavia tale microrganismo è stato isolato solo nel formaggio finito. Il picco **s** comune a tutti i campioni eccetto il formaggio dopo salatura è stato attribuito a *Leuconostoc citreum* ma esso non è mai stato isolato in questi campioni. Il picco **t** è stato attribuito a *Staphylococcus equorum* ed è presente nel formaggio dopo stufatura e nel formaggio finito ma esso è stato isolato solo nel formaggio dopo salatura dove, evidentemente, era presente in quantità più elevate. Infine, il picco **u** detectato in tutti i campioni tranne che nel latte è stato attribuito a *Streptococcus thermophilus* che, come già detto, è stato isolato solo nel formaggio.

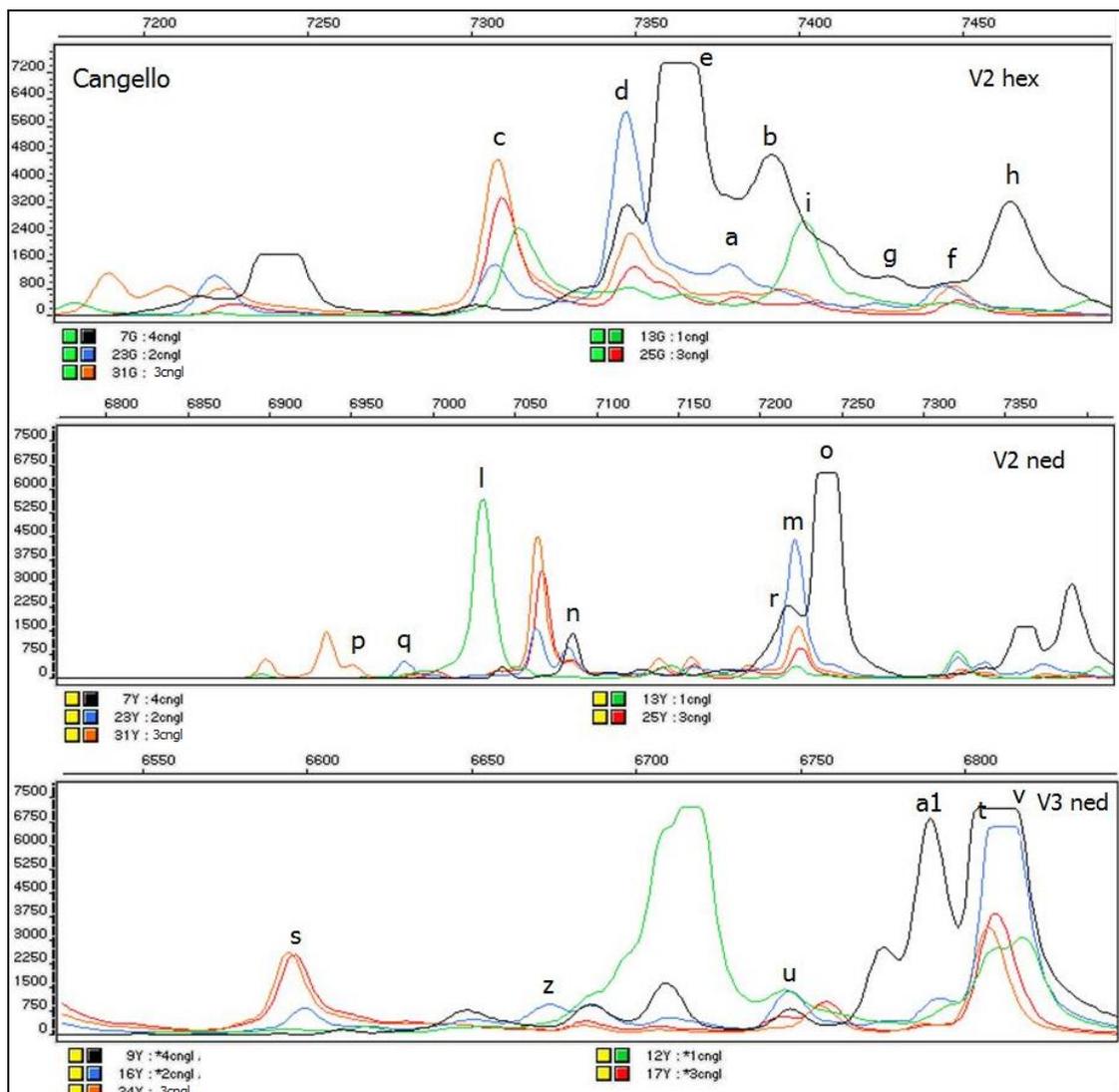


Figura 112: Profili di ciascuno step produttivo del caseificio di Cangello ottenuto nelle regioni V2 e V3 con i diversi coloranti e relativa identificazione dei picchi (discussa nel testo).

L'attribuzione dei picchi detectati nei diversi profili ottenuti nel caseificio di Cangello è rappresentata in figura 112.

Per quanto riguarda l'analisi della regione V2 con il colorante hex il picco **a** comune a cagliata e formaggio dopo salamoia appartiene ad *Acinetobacter* sp., *Lactococcus garviae* e *Microbacterium lacticum*. I primi due microrganismi sono stati isolati entrambi nella cagliata, solo *Lactococcus garviae* nel formaggio dopo salamoia mentre l'ultimo non è stato isolato in nessuno dei due campioni. Il picco **b** presente solo nel formaggio appartiene ad *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Staphylococcus simulans* e *Streptococcus thermophilus*. I primi due microrganismi sono stati isolati nel formaggio a differenza degli altri due. Il picco **c** attribuito ad *Enterococcus casseliflavus* è presente nella cagliata e nel formaggio dopo salamoia ma non è mai stato isolato in tali campioni. Il picco **d** attribuito a *Kocuria rhizophila*, *Serratia proteamaculans* e *Staphylococcus xilosus* appartiene a tutti i campioni dal latte al formaggio finito. Tuttavia solo *Kocuria rhizophila* è stata isolata nel formaggio. Il picco **e** appartiene a *Leuconostoc lactis* e *Lactococcus lactis* ed è stato detectato nel latte e nel formaggio. Entrambi i microrganismi sono stati isolati dal formaggio mentre *Lactococcus lactis* solo dal latte. Il picco **f** appartenente a *Leuconostoc mesenteroides* è stato ritrovato in latte, cagliata e formaggio dopo salamoia. Tale microrganismo è stato ritrovato nel latte e nella cagliata. Il picco **g** apparterebbe a *Staphylococcus aureus* ma non è stato isolato in tale campione.

Il picco **h** identificato come *Staphylococcus equorum* è stato ritrovato nel latte e nel formaggio ma è stato isolato solo nel formaggio. Il picco **i** attribuito a *Streptococcus parauberis* è stato ritrovato nel latte e nella cagliata ma non è stato isolato in tali campioni.

Sempre nella regione V2 ma con il colorante ned il picco **l** appartiene ad *Enterococcus gallinarum* ed è presente solo nel latte ma non è stato isolato in tale campione. Il picco **m** attribuito a *Kocuria rhizophila*, *Serratia proteamaculans* e *Staphylococcus xilosus* è presente in tutti i campioni eccetto il formaggio ma nessuno dei tre microrganismi è stato isolato nei campioni corrispondenti. Il picco **n** appartiene a *Lactococcus garvie* ed è stato ritrovato nella cagliata e nel formaggio dopo salamoia: la sua presenza in tali campioni è stata confermata dagli isolamenti. Il picco **o** è stato identificato come appartenente a *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus parauberis* ed è stato ritrovato nel formaggio: tutti i microrganismi eccetto *Streptococcus parauberis* sono stati isolati su tale campione. Il picco **p** attribuito a *Microbacterium lacticum* è stato ritrovato nel formaggio dopo salamoia ma tale microrganismo non è stato isolato in tale campione, lo stesso vale per il picco **q** identificato come *Rothia* sp. e detectato nella cagliata e per il picco **r** attribuito a *Streptococcus thermophilus* e detectato nel formaggio.

Nella regione V3 il picco s è stato attribuito ad *Enterococcus gallinarum* ed *Enterococcus faecium* ed è stato detectato in tutti i campioni eccetto che nel latte, tuttavia, tali microrganismi non sono stati isolati in questi campioni. Il picco t apparterebbe a *Kocuria rhizophila*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis*, *Serratia proteamaculans* e *Staphylococcus xilosus*. Tale picco è stato detectato nel latte e nel formaggio dopo salamoia: *Lactococcus lactis* è stato isolato in entrambi i campioni mentre le altre tre specie microbiche in nessuno. Il picco u è stato attribuito a *Leuconostoc citreum* e pur essendo presente in tutti i campioni non è mai stato isolato. Lo stesso dicasi per il picco v attribuito a *Microbacterium lacticum* e detectato in latte cagliata e formaggio. Il picco z appartiene a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pasteurii* ed è stato detectato solo nella cagliata, tuttavia in tale campione è stato isolato solo *Staphylococcus aureus*. Infine il picco a1 attribuito a *Streptococcus thermophilus* detectato in tutti i campioni fatta esclusione del latte non è stato isolato nei campioni corrispondenti.

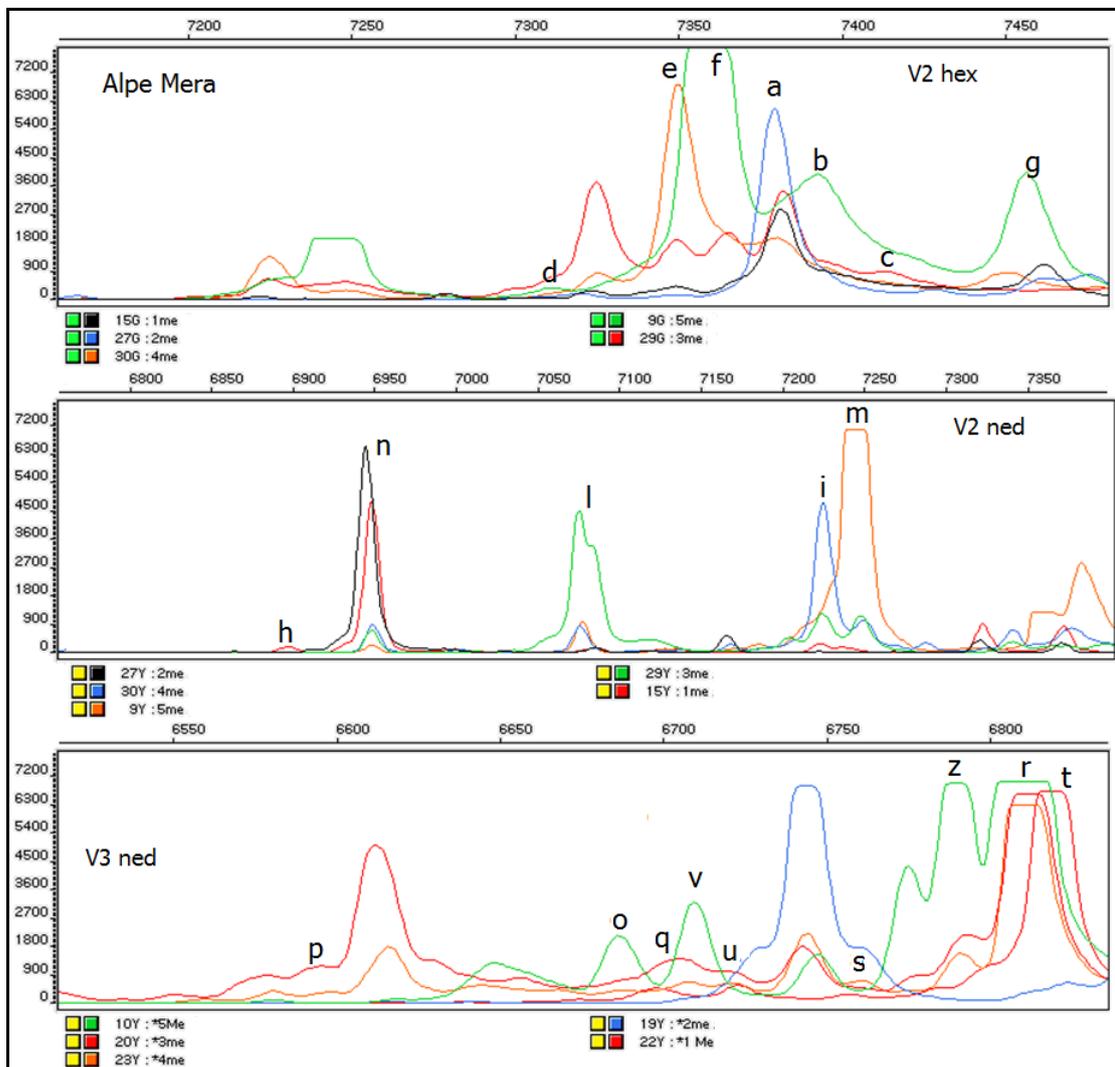


Figura 113: Profili di ciascuno step produttivo del caseificio di Mera ottenuto nelle regioni V2 e V3 con i diversi coloranti e relativa identificazione dei picchi (discussa nel testo).

L'attribuzione dei picchi detectati nei diversi profili ottenuti nel caseificio di Mera è rappresentata in figura 113.

Nella regione V2 con il colorante hex il picco **a** è stato attribuito ad *Acinetobacter* sp., *Microbacterium lacticum* e *Lactococcus garviae* tale picco è comune al latte, alla cagliata, al formaggio di 48h ed a quello di 15gg. *Acinetobacter* e *Lactococcus garviae* sono stati isolati solo nel latte e nella cagliata mentre *Microbacterium lacticum* in nessuno dei campioni. Il picco **b** attribuito ad *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus simulans* è presente solo nel formaggio di due mesi. Il primo è stato più volte isolato mentre il secondo mai. Il picco **c** è stato attribuito ad *Enterococcus gallinarum* e *Staphylococcus pasteurii* detectato nel formaggio di 48h e nel formaggio di 15 gg: la presenza di *Enterococcus gallinarum* è stata confermata dal suo isolamento in entrambi i campioni mentre *Staphylococcus pasteurii* non è stato mai isolato. Il picco **d** detectato solo nel formaggio di 2 mesi è stato attribuito ad *Escherichia coli* sebbene non sia mai stato isolato in tale campione. Il picco **e** è stato attribuito a *Kocuria rhizophila*, *Serratia proteamaculans* e *Staphylococcus xilosus*. Questo era presente in tutti i campioni eccetto il formaggio di 2 mesi tuttavia *Kocuria rhizophila* non è mai stata isolata, *Serratia proteamaculans* solo nel formaggio 15 gg mentre *Staphylococcus xilosus* solo nella cagliata. Il picco **f** appartiene a *Leuconostoc lactis* e *Lactococcus lactis* detectato nel formaggio di 48h e nel formaggio di 2 mesi: in tali campioni è stato isolato solo *Lactococcus lactis*. Il picco **g** è stato attribuito a *Staphylococcus equorum* ed è presente solo nel formaggio di 2 mesi dove, in effetti, è stato più volte isolato.

In regione V2 ma con il fluoroforo ned il picco **h** è stato attribuito ad *Enterococcus gilvus* ed è presente solo nel latte nel quale, tuttavia, non è stato isolato. Il picco **i** appartiene a *Kocuria rhizophila* e *Serratia proteamaculans* ed è comune al latte, al formaggio di 48 h e di 15gg. Come già detto *Kocuria rhizophila* non è mai stata isolata mentre *Serratia proteamaculans* solo nel formaggio 15 gg. Il picco **l** è stato attribuito a *Lactococcus garviae* e *Staphylococcus pasteurii* ed è presente in latte, cagliata e formaggio 48h ma, mentre *Lactococcus garviae* è stato isolato solo nel latte e nella cagliata, il secondo, come già detto, non è mai stato isolato. Il picco **m** è stato attribuito a *Leuconostoc lactis* e *Lactococcus lactis* detectato nel formaggio di 48h, 15gg e 2 mesi: in tutti i campioni è stato isolato solo *Lactococcus lactis*. Il picco **n** appartiene a *Microbacterium lacticum* ed è presente nel latte, nella cagliata e nel formaggio di 48h, tuttavia, come già detto tale microrganismo non è stato ritrovato fra gli isolati.

Infine nella regione V3 con il colorante ned il picco **o** attribuito ad *Enterococcus faecium* ed è stato ritrovato nel formaggio di 15gg e di 2 mesi. Tale attribuzione è stata confermata dall'isolamento di questo microrganismo in entrambi i campioni. Il picco **p** appartiene ad *Enterococcus gallinarum* ed è stato ritrovato nel formaggio di 48h e 15gg. Anche in questo caso abbiamo avuto ulteriore conferma della presenza di tale microrganismo dagli isolamenti nei corrispondenti campioni. Il picco **q** detectato nel latte è attribuito ad

Enterococcus gilvus, tuttavia tale microrganismo è stato isolato a partire dallo step successivo del processo produttivo. Il picco **r** è attribuito alla comigrazione di *Kocuria rhizophila*, *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis*, *Serratia proteamaculans*, *Staphylococcus xilosus* e *Lactococcus garviae*. Tale picco è stato detectato in tutti i formaggi (48h, 15gg e 2 mesi). Tuttavia gli isolamenti hanno permesso di confermare ulteriormente solo la presenza di *Lactococcus garviae* nel formaggio di 48h e 15gg. Il picco **s** appartenente a *Lactobacillus paraplantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* è presente nel latte e nel formaggio di 15gg ma non abbiamo avuto conferma dell'effettiva presenza di tali specie dagli isolamenti. Il picco **t** appartiene a *Microbacterium lacticum* ed è stato detectato nel latte e nella cagliata, tuttavia, tale microrganismo non è stato isolato nei campioni corrispondenti. Lo stesso dicasi per il picco **u** attribuito a *Pediococcus pentosaceus* attribuito al latte, al formaggio 48h e 15gg. Il picco **v** è stato attribuito a *Staphylococcus equorum* ed è stato detectato nel formaggio 48h, 15gg e 2 mesi. La presenza di tale specie è stata ulteriormente confermata dal suo isolamento nei campioni di formaggio 48h e 2 mesi. Il picco **z** appartiene a *Streptococcus thermophilus* ed è presente in tutti e tre i formaggi a diversi stadi di maturazione tuttavia tale microrganismo non è stato isolato in tali campioni.

Alla luce di quanto esposto dunque si nota come il problema delle comigrazioni di diversi generi e specie all'interno di uno stesso picco sia importante e sia già stato descritto da altri autori (75,76). Questo fa sì che, a fronte di un numero di specie elevato che possono essere identificate con tale metodica, tuttavia, l'attribuzione dei picchi non sia univoca e ci si debba riferire ai risultati ottenuti dagli isolamenti sui terreni colturali. Nei confronti di questi ultimi però bisogna sempre tenere conto dei limiti cui spesso essi sono associati fra i quali la bassa selettività oltre che la difficoltà di isolare specie minoritarie in presenza di specie dominanti.

Dopo l'analisi di tutti i campioni e l'identificazione putativa di tutti i picchi delle comunità è stato effettuato lo studio degli indici di diversità caratteristici di ciascuna popolazione microbica presente sui campioni in modo da poterle confrontare l'un l'altra. Si sono determinati dunque l'indice di Shannon-Weaver o di Diversità ($S = -\sum P_i * \log_2 P_i$) e l'indice di Equitabilità ($E = H / \log_2 S$) mentre la possibilità di una valutazione della ricchezza è offerta dal conto dei numeri dei picchi ottenuti per ciascuna comunità. Nel nostro studio l'indice di diversità microbica più idoneo all'uso è quello di Equitabilità in quanto adatto ad effettuare un confronto fra popolazioni aventi anche un numero di specie ma soprattutto picchi differenti.

Tutti tali risultati sono riassunti nelle tabelle 55-57 nelle quali in rosso sono riportate le specie alle quali sono stati attribuiti i picchi nelle comunità. I numeri indicati al di sotto di ciascun campione rappresentano le percentuali dell'area attribuita allo specifico microrganismo (*ratio*) rispetto all'area totale. I numeri sono sottolineati quando il microrganismo cui il picco è riferito è stato anche isolato nel campione corrispondente. Le *ratio* sono indicate con diversi colori e colori uguali rappresentano aree condivise da più microrganismi ovvero i microrganismi

corrispondenti comigrano all'interno di quel picco. Sul fondo delle tabelle invece sono riportate le aree del profilo non identificate, il numero dei picchi ottenuti da ciascun campione nonché l'indice di Shannon-Weaver e di Equitabilità.

| Carcoforo | V2 | | | | Form | V2 | | | | Form | V3 | | | | Form |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | HEX | 2crf | 3crf | 4crf | aggio | NED | 2crf | 3crf | 4crf | aggio | NED | 2crf | 3crf | 4crf | aggio |
| | 1crf | | | | | 1crf | | | | | 1crf | | | | |
| Acinetobacter | 6.8 | | | | 3.1 | | | | | | | | | | |
| E. faecalis | | | | | 18.9 | | | | | | | | | | |
| E. casseliflavus | 2.2 | 2.7 | 2.1 | 1.5 | | | | | | | | | | | |
| E. durans | | | | | 18.9 | | | | | | | | | | |
| E. faecalis PFK3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| E. faecium | | | | | | | | | | | 7.2 | 2.3 | 5.2 | | 2.4 |
| E. gallinarum | | | | | | | | | | | | | | | |
| E. gilvus | | | | | | | | | | | | | | | |
| E. coli | 2.2 | 2.7 | 2.1 | 1.5 | | | | | | | | | | | |
| Kocuria rizophila | 13.1 | 36.1 | 41.1 | 52.2 | 53 | 12.5 | 60.7 | 57.8 | 60.6 | | 16.8 | 55.8 | 37.5 | 47.3 | 51 |
| L. garviae | 6.8 | | | | 3.1 | | | | | | 16.8 | 55.8 | 37.5 | 47.3 | 51 |
| L. lactis | 8.5 | 26.3 | 22.7 | 19.5 | | | | | | | | | | | |
| L. paraplantarum | | | | | | 6.1 | | | | 37 | 13 | | | 6.5 | |
| Leuc. citreum | | | | | | 16.7 | | | | | 12.9 | 8 | 4.1 | | 2.1 |
| Leuc. mesenteroides | 17.7 | 15.2 | 17.4 | 12.4 | 12.4 | | | | | | | | | | |
| Leuc. lactis | 8.5 | 26.3 | 22.7 | 19.5 | | | | | | | 16.8 | 55.8 | 37.5 | 47.3 | 51 |
| Microbacterium lacticum | 6.8- 4.7 | | | | 3.1 | 1.3 | 1 | | | | | | | | |
| Pediococcus pentosaceus | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pseudomonas synxantha | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rothia | | | | | | 32.2 | 1.8 | 5.4 | 4.6 | 1 | | | | | |
| Serratia proteamaculans | 13.1 | 36.1 | 41.1 | 52.2 | 53 | 12.5 | 60.7 | 57.8 | 60.6 | | 16.8 | 55.8 | 37.5 | 47.3 | 51 |
| St. aureus | | | | | | | | | | | 13.9 | 3 | | 7.8 | |
| St. equorum | 11.4 | | | | | | | | | | | | 6.7 | | 3.1 |
| St. pasteurii | | | | | | | | | | | 13.9 | 3 | | 7.8 | |
| St. simulans | | | | | 18.9 | 3.2 | 1.7 | | | | | | | | |
| St. xilosus | 13.1 | 36.1 | 41.1 | 52.2 | 53 | | | | | | 16.8 | 55.8 | 37.5 | 47.3 | 51 |
| Str. parauberis | | | | | | 6.1 | | | | 37 | | | | | |
| Str. thermophilus | | | | | 18.9 | 12.5 | 60.7 | 57.8 | 60.6 | | | 5.6 | 19.4 | 5.9 | 16.2 |
| Area non identificata | 26 | 8 | 3.4 | | 6.5 | 25 | 33 | 37 | 34 | 26 | 21.6 | 23.3 | 17.3 | 28.8 | 18.3 |
| Numero dei picchi | 16 | 8 | 7 | 5 | 6 | 14 | 9 | 9 | 11 | 8 | 14 | 9 | 10 | 9 | 11 |
| Shannon index | 3,6 | 2,3 | 2,2 | 1,8 | 2,0 | 3,0 | 1,8 | 2,1 | 2,1 | 2,1 | 3,4 | 2,1 | 2,7 | 2,5 | 2,4 |
| Max Shannon | 4,0 | 3,0 | 2,8 | 2,3 | 2,6 | 3,8 | 3,2 | 3,2 | 3,5 | 3,0 | 3,8 | 3,2 | 3,3 | 3,2 | 3,5 |
| Equitabilità | 0,91 | 0,77 | 0,77 | 0,78 | 0,76 | 0,79 | 0,57 | 0,65 | 0,60 | 0,70 | 0,89 | 0,66 | 0,81 | 0,79 | 0,68 |

Tabella 55: risultati relativi al caseificio di Carcoforo

| Cangello | V2 HEX | 2Cngl | 3Cngl | 4Cngl | V2 | 2Cngl | 3Cngl | 4Cngl | V3 | 2Cngl | 3Cngl | 4Cngl |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1Cngl | | | | NED | | | | NED | | | |
| Acinetobacter | | 18.1 | 7 | | | | | | | | | |
| E. faecalis | | | | 24 | | | | | | | | |
| E. casseliflavus | | 11.2 | 40.7 | | | | | | | | | |
| E. durans | | | | 24 | | | | | | | | |
| E. faecalis PFK3 | | | | | | | | | | | | |
| E. faecium | | | | | | | | | | | | |
| E. gallinarum | | | | | 63.9 | | | | | 4.3 | 2.4 | 3.3 |
| E. gilvus | | | | | | | | | | | | |
| E.coli | | | | | | | | | | | | |
| E. faecium STP | | | | | | | | | | 4.3 | 2.4 | 3.3 |
| Kocuria rizophila | 6.7 | 44.3 | 22,8 | 9.3 | 3.8 | 44.7 | 15.6 | | 11.4 | | 20.6 | |
| L. garviae | | 18.1 | 7 | | | 7.8 | 7.5 | | | | | |
| L. lactis | 5.8 | | | 34.1 | | | | 41.5 | 11.4 | | 20.6 | |
| L. paraplantarum | | | | | | | | | | | | |
| Leuc. citreum | | | | | | | | | 10.6 | 7 | 2.6 | 2.6 |
| Leuc. mesenteroides | 3.9 | 9.9 | 5.9 | | | | | | | | | |
| Leuc.lactis | 5.8 | | | 34.1 | | | | 41.5 | 11.4 | | 20.6 | |
| Microbacterium lacticum | | 18.1 | 7 | | | | | | 14.8 | 41.4 | | 40.7 |
| Pediococcus pentosaceus | | | | | | | | | | | | |
| Pseudomonas synxantha | | | | | | | | | | | | |
| Rothia | | | | | | 5.1 | | | | | | |
| Serratia proteamaculans | 6.7 | 44.3 | 22,8 | 9.3 | 3.8 | 44.7 | 15.6 | | 11.4 | | 20.6 | |
| St. aureus | | | | 3.4 | | | | | | 4.6 | | |
| St. equorum | 1.9 | | | 17.1 | | | | | 58.5 | 3.8 | 2 | 5.3 |
| St. pasteurii | | | | | | | | | | 4.6 | | |
| St. simulans | | | | 24 | | | | | | | | |
| St. xilosus | 6.7 | 44.3 | 22,8 | 9.3 | 3.8 | 44.7 | 15.6 | | 11.4 | | 20.6 | |
| Str.parauberis | 29.2 | | 4.5 | | | | | 41.5 | | | | |
| Str.thermophilus | | | | 24 | | | | 13.4 | | 4.6 | | 18.6 |
| Area non identificata | 48.0 | 17.0 | 16.0 | 10.0 | 30.0 | 42.0 | 77.0 | 45.0 | 4.6 | 32.0 | 72.0 | 22 |
| Numero dei picchi | 13 | 9 | 11 | 8 | 10 | 12 | 17 | 10 | 7 | 12 | 10 | 9 |
| Indice di Shannon | 3.0 | 2.4 | 2.6 | 2.5 | 1.9 | 2.8 | 3.1 | 2.5 | 1.8 | 2.9 | 2.5 | 2.6 |
| Max Shannon | 3.7 | 3.2 | 3.5 | 3.0 | 3.3 | 3.6 | 4.1 | 3.3 | 2.8 | 3.6 | 3.3 | 3.2 |
| Equitabilità | 0.81 | 0.76 | 0.75 | 0.82 | 0.58 | 0.78 | 0.76 | 0.75 | 0.66 | 0.79 | 0.75 | 0.81 |

Tabella 56: risultati relativi al caseificio di Cangello.

| Alpe Mera | V2 | | | | | V2 | | | | | V3 | | | | |
|-------------------------|------------|------|------|------|------|------------|------|-------|-------|-------|------------|------|-------|-------|------|
| | HEX 1Me | 2Me | 3Me | 4Me | 5Me | NED 1Me | 2Me | 3Me | 4Me | 5Me | NED 1Me | 2Me | 3Me | 4Me | 5Me |
| Acinetobacter | 44.9 | 56.6 | 22.7 | 19.4 | | | | | | | | | | | |
| E. faecalis | | | | | 28.8 | | | | | | | | | | |
| E. casseliflavus | | | | | | | | | | | | | | | |
| E. durans | | | | | | | | | | | | | | | |
| E. faecalis PFK3 | | | | | | | | | | | | | | | |
| E. faecium | | | | | | | | | | | | | | 1.8 | 5.1 |
| E. gallinarum | | | 7.7 | 3.3 | | | | | | | | | 3.5 | 1.3 | |
| E. gilvus | | | | | | 2.5 | | | | | 3.5 | | | | |
| E.coli | | | | | 1.3 | | | | | | | | | | |
| Kocuria rhizophila | 5.6 | 1.5 | 9.4 | 44.8 | | 3.4 | 10.6 | 43.5 | | | | | 32.2 | 38.9 | 35.5 |
| L. garviae | 44.9 | 56.6 | 22.7 | 19.4 | | 2.3 | 2 | 18.6 | | | | | 32.2 | 38.9 | 35.5 |
| L. lactis | | | 11 | | 40 | | | 11 | 9.7 | 69 | | | 32.3 | 38.9 | 35.5 |
| L. paraplantarum | | | | | | | | | | | 1.9 | | | 2.8 | |
| Leuc. citreum | | | | | | | | | | | | 74.2 | 6.9 | 9 | 3.8 |
| Leuc. mesenteroides | | | | | | | | | | | 1.9 | | | 2.8 | |
| Leuc.lactis | | | 11 | | 40 | | | 11 | 9.7 | 69 | | | 32.3 | 38.9 | 35.5 |
| Microbacterium lacticum | 44.9 | 56.6 | 22.7 | 19.4 | | 53.5 | 75.2 | 4.2 | | | 61 | 6.1 | | | |
| Pediococcus pentosaceus | | | | | | | | | | | 4.1 | | 2.8 | 2.7 | |
| Pseudomonas synxantha | | | | | | | | | | | | | | | |
| Rothia | | | | | | | 1.7 | | | | | | | | |
| Serratia proteamaculans | 5.6 | 1.5 | 9.4 | 44.8 | | 3.4 | 10.6 | 43.5 | | | | | 32.3 | 38.9 | 35.5 |
| St. aureus | | | | | | | | | | | | | | | |
| St. equorum | | | | | 17.8 | | | | | | | | 8.8 | 3.5 | 7.2 |
| St. pasteurii | | | 7.7 | 3.4 | | 2.3 | 2 | 18.6 | | | | | | | |
| St. simulans | | | | | 28.8 | | | | | | | | | | |
| St. xilosus | 5.6 | 1.5 | 9.4 | 44.8 | | | | | | | | | 32.3 | 38.9 | 35.5 |
| Str. parauberis | | | | | | | | | | | | | | | |
| Str.thermophilus | | | | | | | | | | | | | 6.6 | 6.4 | 17 |
| Area non identificata | 43.3 | 39.3 | 18.4 | 25.1 | | 29 | 18.2 | 55.9 | 38.6 | 29.3 | 29.1 | 19.2 | 37.1 | 32.4 | 22.9 |
| Numero dei picchi | 11 | 9 | 12 | 11 | 5 | 13 | 9 | 10 | 10 | 7 | 8 | 4 | 11 | 14 | 9 |
| Indice di Shannon | 2.50 | 2.10 | 3.00 | 2.50 | 1.90 | 2.4 | 1.4 | 2.8 | 2.5 | 1.5 | 1.7 | 1.09 | 2.67 | 3 | 2.76 |
| Max Shannon | 3.46 | 3.17 | 3.58 | 3.46 | 2.32 | 3.7 | 3.2 | 3.322 | 3.322 | 2.807 | 3 | 2 | 3.459 | 3.807 | 3.17 |
| Equitabilità | 0.72 | 0.66 | 0.84 | 0.72 | 0.82 | 0.65 | 0.44 | 0.84 | 0.74 | 0.53 | 0.57 | 0.55 | 0.77 | 0.79 | 0.87 |

Tabella 57: risultati relativi al caseificio di Mera

Dall'osservazione dei risultati ottenuti nelle tabelle è possibile notare diversi aspetti. Innanzitutto si osserva come alcune specie comigrino sempre in corrispondenza dello stesso datapoint ed il fenomeno si ripeta sia nella regione V2 con entrambi i coloranti che nella regione V3. È questo il caso ad esempio di *Leuconostoc lactis* e *Lactococcus lactis* o di *Kocuria rhizophila* e *Serratia proteamaculans*. Fatto che si può presumibilmente giustificare con un'elevata similarità di sequenza in entrambe le regioni ipervariabili. Nel nostro lavoro l'utilizzo della doppia marcatura nella regione V2 era stato adottato proprio per "risolvere" quelle specie microbiche che presentavano alta similarità di sequenza ma, come già osservato, non si è riusciti nell'intento. Tale accorgimento era stato adottato a fronte di un aspetto descritto in letteratura (50,51) ovvero la corruzione che può essere introdotta dai fluorofori stessi che possono portare a lunghezze di sequenza diverse da quelle attese a seconda che se ne utilizzi uno piuttosto che un altro. Inoltre, sempre alla luce delle precedenti osservazioni, si noti come il numero di picchi detectati in corrispondenza dello stesso campione

cambi non solo fra la regione V2 e V3 ma anche fra quelli rilevati all'interno della stessa V2 utilizzando fluorofori differenti. In riferimento al numero dei picchi detectati nelle diverse regioni con i diversi coloranti si osserva come, in generale, in tutti i caseifici il numero di picchi più elevato sia riscontrato sempre nel latte a rappresentare un substrato caratterizzato da una popolazione microbica più composita. Tale valore raggiunge i valori più bassi nel formaggio finito nel quale si vanno a consolidare specie microbiche dominanti. Uniche eccezioni a questo *trend* sono state registrate in regione V3 nel caseificio di Cangelo in cui il latte ha dato 7 picchi mentre il formaggio 9 e nel caseificio di Mera in cui il latte ha dato 8 picchi mentre il formaggio 9. In regione V2 con il fluoroforo ned invece sono stati registrati 10 picchi sia nel latte che nel formaggio. Tuttavia tenendo conto delle numerose comigrazioni di specie all'interno di uno stesso picco non è detto che la riduzione del numero dei picchi corrisponda necessariamente ad una riduzione del numero delle specie.

Nelle figure 114-116 sono invece riportati i profili delle comunità ottenuti in ciascuna regione V2 e V3 e con i diversi coloranti nei tre caseifici. In questo modo si possono visualizzare le differenze riscontrate nel tracciato dei tre caseifici in corrispondenza di una specifica regione e di un dato fluoroforo.

Nella regione V2, con il colorante hex (figura 114), il profilo dei campioni di Carcoforo è quello che presenta un minor numero di picchi rispetto a quelli di Cangelo e di Mera. Questi ultimi, peraltro, presentano profili piuttosto simili.

Nella regione V2, con fluoroforo ned (figura 115), il profilo di Carcoforo, pur presentando meno differenze rispetto a quelli di Cangelo e Mera, mostra 2 picchi (indicati con le frecce verdi) che sono assenti in questi ultimi. Mentre il primo picco (indicato con "1") non è stato identificato il secondo (indicato con "2") era stato attribuito a *Lactobacillus paraplantarum* e *Streptococcus parauberis*. I profili di Cangelo e Mera sono ancora piuttosto simili eccetto il picco indicato con la freccia rossa ed attribuito ad *Enterococcus gallinarum* ed il picco indicato con la freccia blu attribuito a *Microbacterium lacticum*.

Infine nella regione V3 (figura 116) le differenze fra i tre caseifici si riducono notevolmente: solo nel caseificio del Cangelo, in corrispondenza del latte, abbiamo un alto picco indicato con la freccia arancio che purtroppo non è stato identificato.

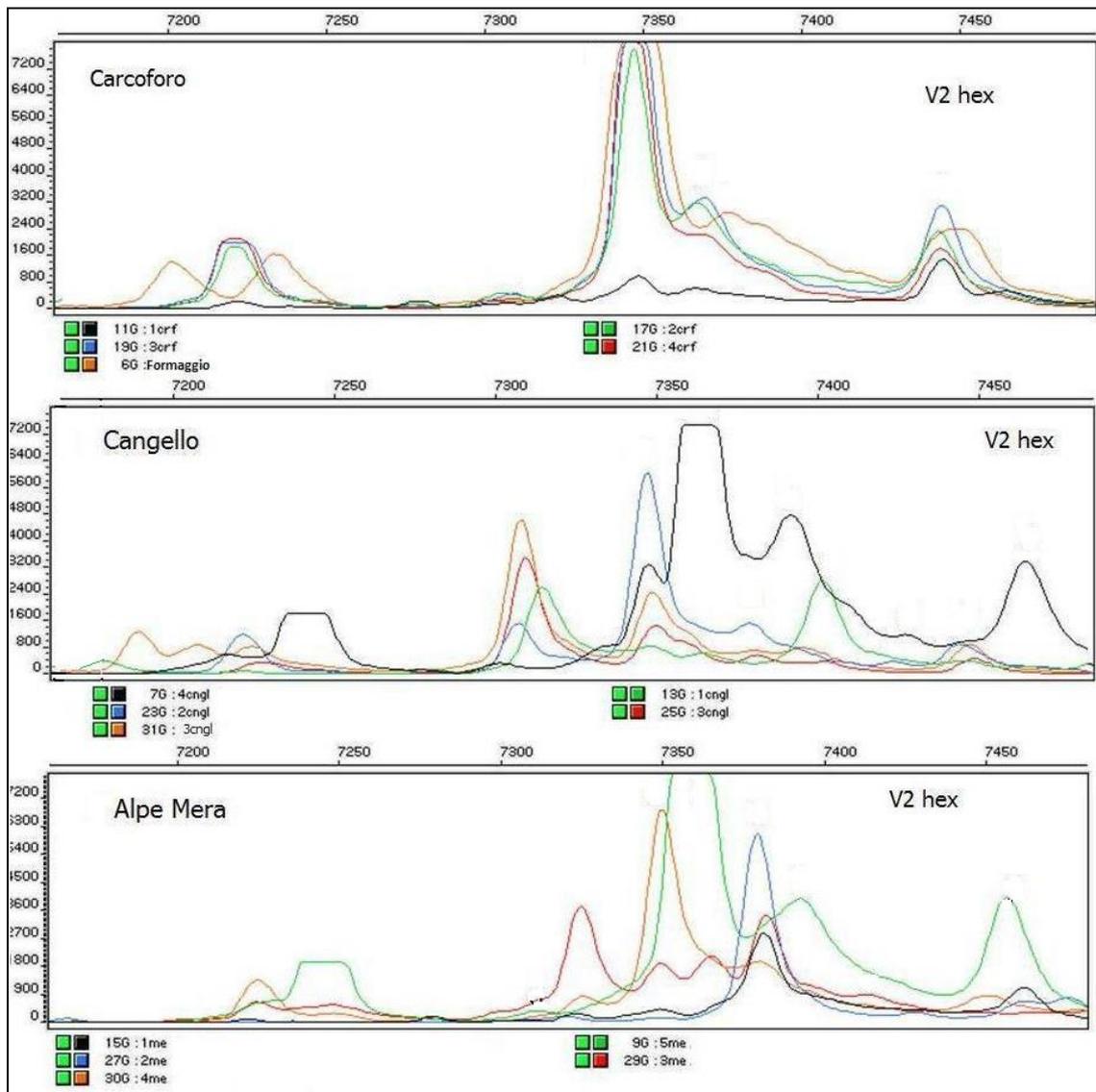


Figura 114: profili ottenuti nella regione V2 con il fluoroforo hex in ciascun caseificio.

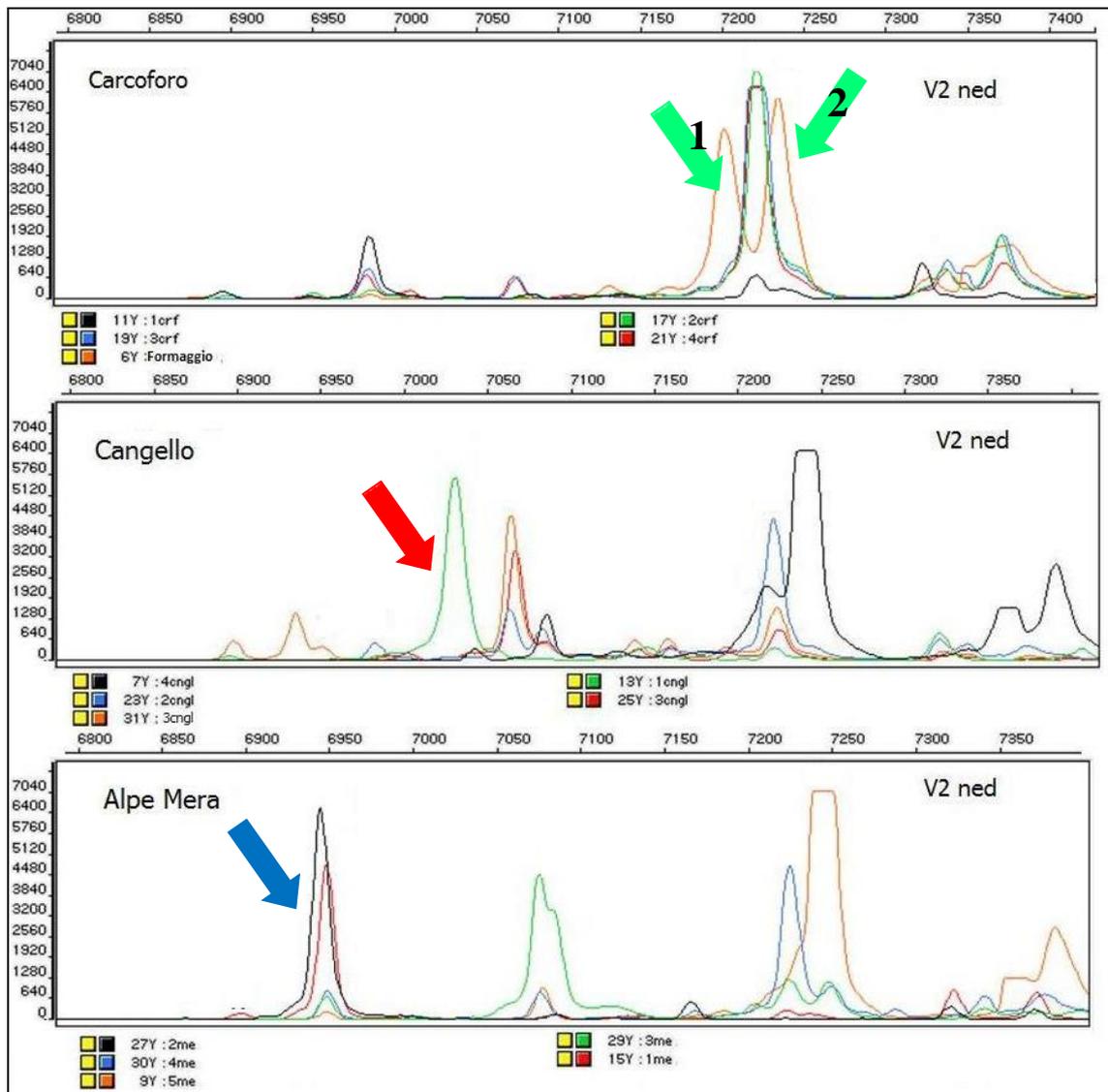


Figura 115: profili ottenuti nella regione V2 con il fluoroforo ned in ciascun caseificio.

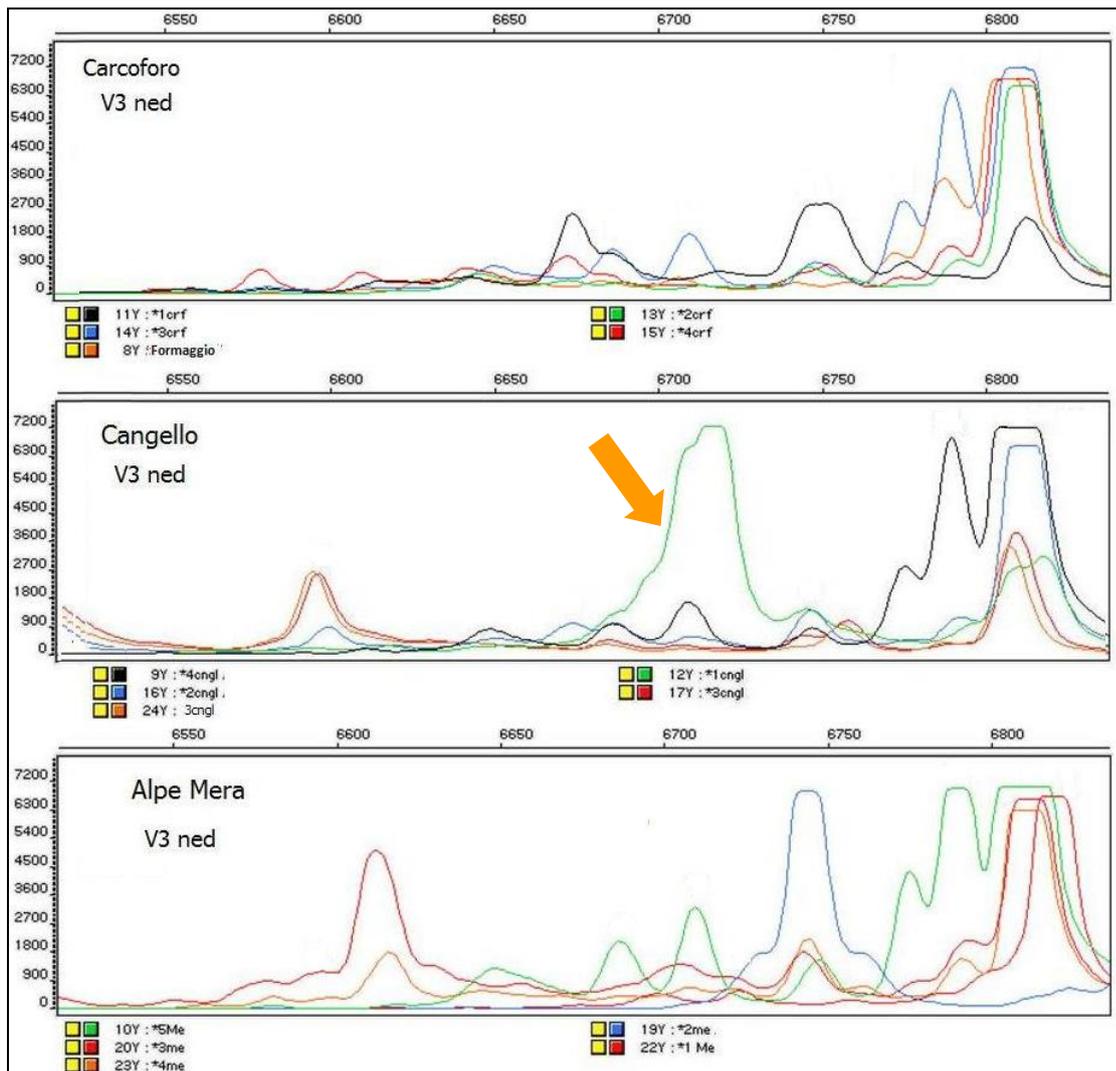


Figura 116: profili ottenuti nella regione V3 con il fluoroforo ned in ciascun caseificio.

4.6.4 DGGE PCR (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)

La metodica DGGE rappresenta l'ultima applicata. Anche in questo caso la porzione genomica studiata è stata la regione 16S dell'operone ribosomale.

Il lavoro iniziale è stato quello di messa a punto del metodo dal momento che, qui, oltre che la scelta dei *primers* e dunque della regione variabile da amplificare anche il gradiente di denaturazione è un fattore determinante.

Il gradiente di denaturazione inizialmente adottato è stato 40-60% che è generalmente utilizzato per discriminare fra batteri appartenenti a comunità delle quali non si ha nessuna conoscenza e sulle quali non è mai stata applicata l'analisi DGGE. I *primers* utilizzati inizialmente sono stati quelli riportati in tabella 58. Questi amplificano le regioni variabili dell'operone ribosomale V3-V5 ed erano stati utilizzati da Sass (113) in microbiologia ambientale per lo studio delle comunità microbiche presenti in bacini ipersalini.

| Primers | Sequenza | Target |
|-------------|--|----------------------------|
| 907R | 907R-(5'-CCG TCAATT CCTTTGAGTTT-3') | regione V5 del 16S rRNA |
| 357F- GC | 357F-GC-(5'-CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCC GGCCCCGCCGCCCCGCCCCC-TACGGGAGGCAGCAG-3') | regione V3 del 16S rRNA |
| 357F | 357F-(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') | regione V3 del 16S rRNA |

Tabella 58

La corsa su gel di poliacrilammide di quattro campioni appartenenti al caseificio di Carcoforo è rappresentata in figura 117. Da questa possiamo osservare che da ciascun campione abbiamo ottenuto solo due bande di cui una molto più intensa. Questo significa che, molto probabilmente, la scelta dei *primers* non è adeguata: evidentemente i microrganismi che compongono le comunità presenti sui substrati alimentari presentano nelle regioni V3-V5 sequenze molto simili cosicchè si raccolgono in due domini di denaturazione principali. Inoltre, vista l'intensità della banda sottostante, si è pensato di restringere il *range* denaturante (da 40 a 55% anziché da 40 a 60%) per separare e vedere in dettaglio i domini di denaturazione che si concentrano sul fondo del gel. Le bande ottenute in questa corsa non erano state *excise*.

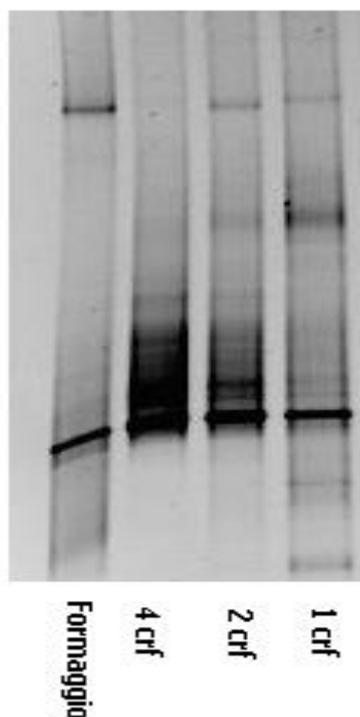


Figura 117: Profili DGGE ottenuti dalla corsa del latte (1crf), della cagliata (2crf), del formaggio dopo salamoia (4crf) e del formaggio (40gg) in un range denaturante 40-60%.

Dopo attenta ricerca bibliografica si è deciso di utilizzare dei *primers* che fossero più idonei al nostro substrato alimentare (Tabella 59)

| Primers | Sequenza | Target |
|---------|---|----------------------------|
| 63 F-GC | 63F-(3' CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCC GGCCCGCCGCCCCGCCCCCAGGCCTAA CACATGCAAGTC5') | regione V1 del 16S rRNA |
| 63 F | 63F-(3' CAGGCCTAACACATGCAAGTC5') | regione V1 del 16S rRNA |
| 518 R | 518R-(3' ATTACCGCGGCTGCTGG | regione V3 del 16S rRNA |

Tabella 59

Tali *primers* infatti erano stati per la prima volta utilizzati per studiare l'effetto di erbicidi sulle comunità microbiche del suolo (112) ma erano poi stati utilizzati efficacemente per lo studio di prodotti caseari quali la mozzarella (118), di acque minerali (119) e di altri prodotti alimentari. La sequenza dei *clamp* GC invece era mantenuta uguale alla precedente per non introdurre ulteriori variabili nella sperimentazione. Il ciclo termico invece era stato messo a punto in seguito a prove di amplificazione con gradiente di temperature di *annealing* comprese fra 48° e 58°C: la temperatura che dava maggiore risposta all'amplificazione in termine di intensità di bande ottenute su gel di verifica era 53°C. Tale T_m dunque è stata mantenuta durante tutta la sperimentazione.

Dopo amplificazione dei campioni di tutti i caseifici e corsa su gel di poliacrilammide con il nuovo *range* di denaturazione si è ottenuto il *fingerprint* mostrato in figura 118. Le bande sono

state *excise* direttamente dal gel riportato in foto ed i numeri dei frammenti identificati corrispondono a quelli riportati in figura.

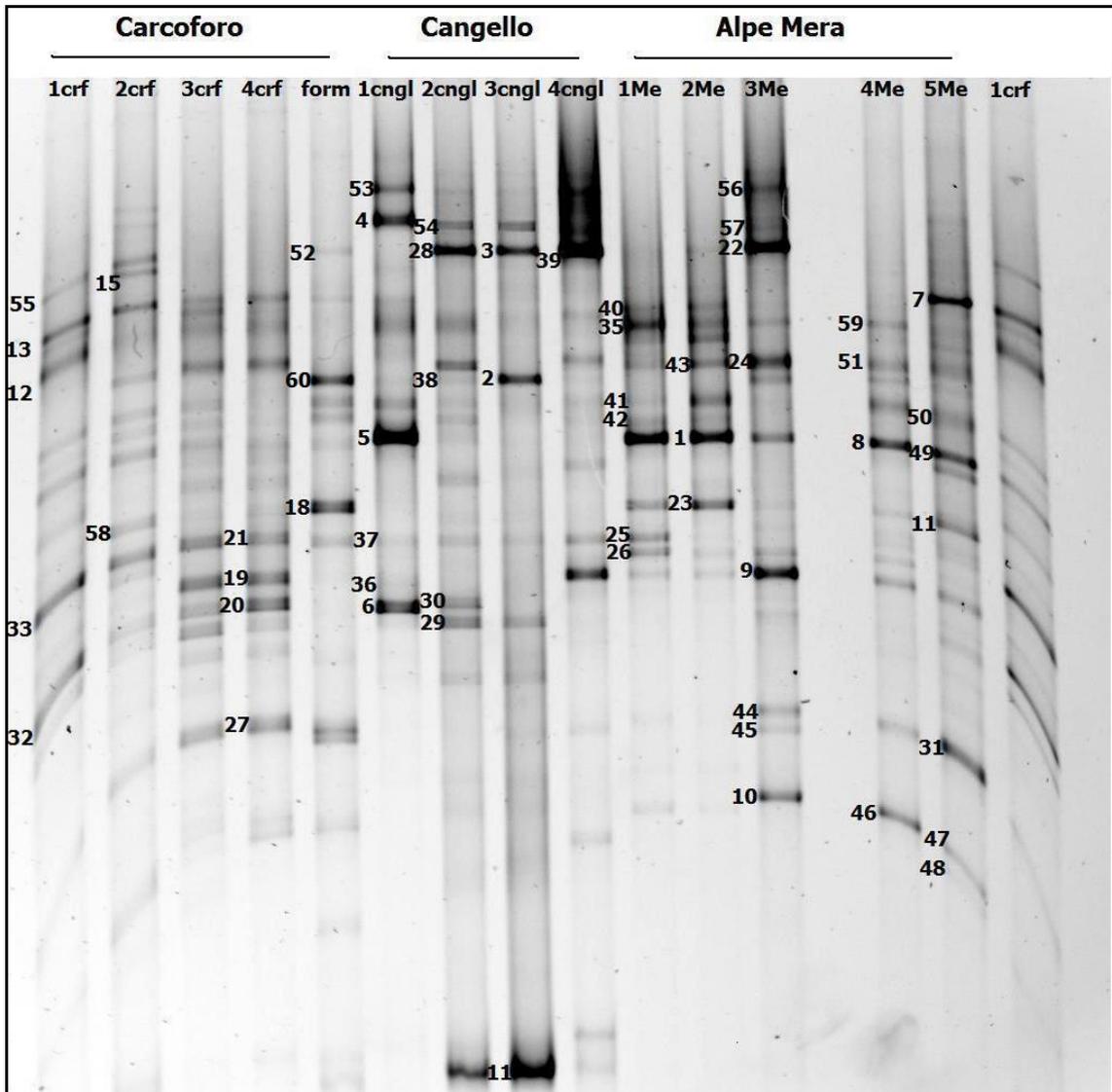


Figura 118: Profili DGGE di tutti i campioni corrispondenti a ciascuno step produttivo per ogni caseificio in un range denaturante 40-55%. Da sinistra a destra per il caseificio di Carcoforo sono: 1crf=latte, 2crf=cagliata, 3crf=formaggio dopo stufatura, 4crf=formaggio dopo salamoia, form =formaggio 40gg. Per il caseificio di Cangelo : 1cnagl=latte, 2cnagl=cagliata, 3cnagl=formaggio dopo salamoia, 4cnagl=formaggio 40 . Per il caseificio di Alpe Mera: 1Me= latte, 2Me=cagliata, 3Me=formaggio 48h, 4Me= formaggio 15gg, 5Me=formaggio 2 mesi.

I campioni hanno dato in profilo DGGE un numero di bande variabile fra loro e fra i diversi caseifici.

Tali numeri sono riportati in tabella 60.

| | Latte | Cagliata | Formaggio dopo stufatura | Formaggio dopo salamoia | Formaggio 15 gg | Formaggio finito |
|------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------|---------------------|
| Carcoforo | 14 | 17 | 17 | 17 | nd | 13 |
| Cangelo | 8 | 14 | nd | 6 | nd | 14 |
| Alpe Mera | 13 | 11 | nd | 16 | 12 | 18 |

Tabella 60: numero bande detectate nel profilo di ciascun campione mediante analisi DGGE

L'intensità delle bande ottenute era variabile ed alcune, nonostante siano stati effettuati numerosi gel, risultavano sempre davvero molto chiare e dunque di difficile *excisione*.

Dopo essere state tagliate dal gel le bande sono state riamplicate con i medesimi *primers* utilizzati in precedenza e riportati in tabella 59, ma privi dei *clamp-GC* in maniera tale da purificarle prima del sequenziamento.

I risultati ottenuti dal sequenziamento delle bande *excise* sono riportati in tabella 61.

| N° banda | Identificazione | Percentuale di omologia | Accession number |
|-----------------|--|--------------------------------|-------------------------|
| 1-8-49-59 | <i>Acinetobacter johnsonii strain BA28</i> | 100% | gi 209967482 |
| 33 | <i>Acinetobacter sp. a5</i> | 96% | gi 116043972 |
| 13 | <i>Acinetobacter sp. AKB-2008-JO101</i> | 100% | gi 224027657 |
| 26-40-42 | <i>Acinetobacter sp. CL1405</i> | 100% | gi 112148861 |
| 20-30-33-32 | <i>Acinetobacter sp. FR2_4</i> | 100% | gi 197947116 |
| 19-32 | <i>Acinetobacter sp. FR-W5Bb</i> | 98% | gi 238652710 |
| 48-50 | <i>Bacterium F5</i> | 99% | gi 256665442 |
| 41-23-43 | <i>Bacterium G6</i> | 100% | gi 256665449 |
| 15 | <i>Chryseobacterium sp. NF 1107</i> | 94% | gi 193783055 |
| 45 | <i>Cronobacter muytjensii strain Jor149</i> | 90% | gi 237651830 |
| 11 | <i>Enterobacter sp. DgG7</i> | 100% | gi 222543527 |
| 18 | <i>Enterococcus faecalis strain CVCC A31</i> | 98% | gi 241865358 |
| 21 | <i>Gamma proteobacterium PQS-1</i> | 93% | gi 239582661 |
| 47 | <i>Klebsiella sp. D81</i> | 98% | gi 115353930 |
| 24-51 | <i>Klebsiella sp. XW721</i> | 91% | gi 188529524 |
| 7 | <i>Lactobacillus paraplantarum strain MH62</i> | 91% | gi 220966723 |
| 58 | <i>Lactobacillus plantarum strain Z6</i> | 90% | gi 170652583 |
| 56-57 | <i>Lactococcus garvieae strain IMAU50094</i> | 98% | gi 237512217 |
| 3-28-39-22-52 | <i>Lactococcus garvieae strain IMAU50158</i> | 99% | gi 225029384 |
| 54 | <i>Lactococcus garvieae strain Ir-170A</i> | 99% | gi 259157391 |
| 12 | <i>Leuconostoc citreum strain W-4</i> | 99% | gi 211940070 |
| 2-38-60 | <i>Leuconostoc mesenteroides strain LHICA_53_3</i> | 98% | gi 224180808 |
| 4 | <i>Pseudomonas antarctica</i> | 98% | gi 220981176 |

| | | | |
|----------|--|------|--------------|
| 37-53 | <i>Pseudomonas sp. Air236</i> | 99% | gi 259121301 |
| 5 | <i>Pseudomonas sp. EY4-09-10</i> | 100% | gi 85539350 |
| 6-36 | <i>Pseudomonas sp. W1</i> | 100% | gi 193084950 |
| 25 | <i>Soil bacterium Carb-S1A-MILLSSL-2</i> | 90% | gi 179365860 |
| 29 | <i>Uncultured Acinetobacter sp. clone 2P-3-2-C04</i> | 100% | gi 189305699 |
| 55 | <i>Uncultured Acinetobacter sp. clone VE31G01</i> | 95% | gi 239923995 |
| 31 | <i>Uncultured bacterium</i> | 99% | gi 83763808 |
| 35 | <i>Uncultured bacterium clone nbw225b06c1</i> | 100% | gi 238312181 |
| 9 | <i>Uncultured Klebsiella sp. clone F7apr.10</i> | 99% | gi 257072658 |
| 27 | <i>Uncultured Klebsiella sp. clone Hg5-13</i> | 95% | gi 164653350 |
| 10-44-46 | <i>Uncultured Raoultella</i> | 96% | gi 257074345 |

Tabella 61: Risultato del sequenziamento delle bande direttamente excise da gel di poliacrilammide.

I profili ottenuti dai campioni di Carcoforo sono apparsi abbastanza simili tra loro e nei primi quattro sono presenti molte bande comuni (indicate solo una volta in figura 118). In particolare: le bande 13, 32 e 33, corrispondenti ad *Acinetobacter* sp., sono sempre presenti dal latte fino al formaggio dopo salamoia. Anche la banda 12, identificata come *Leuconostoc citreum* ceppo W-4, è presente durante tutto il processo produttivo e permane nel formaggio di 40 gg. Il profilo del formaggio risulta essere diverso da quello dei campioni precedenti e, in particolare, diventa marcata la banda 18 corrispondente ad *Enterococcus faecalis* e compare la banda 60 attribuita a *Leuconostoc mesenteroides* ceppo LHICA_53_3 entrambi più volte isolati in tale prodotto.

I profili di Cangello hanno dato un numero di bande minore rispetto a quelli di Carcoforo e sono più differenziati gli uni rispetto agli altri. Nello specifico nel latte troviamo 3 bande particolarmente intense ed altre minori tutte ascrivibili al genere *Pseudomonas* o *Klebsiella*. Nella cagliata compare una banda molto intensa (28) attribuita a *Lactococcus garvieae* ceppo IMAU50158; la banda 38, molto chiara, è stata attribuita a *Leuconostoc mesenteroides* mentre le bande 30 e 29 sono ascrivibili ancora al genere *Acinetobacter*. Nel formaggio dopo salamoia rimane molto intensa la banda attribuita a *Lactococcus garvieae* (3) e ne compare anche una seconda verosimilmente appartenente allo stesso genere (54). Inoltre acquista intensità la banda 2 identificata come *Leuconostoc mesenteroides*. Sul fondo del tracciato sono ancora presenti bande ascrivibili al genere *Acinetobacter*. Infine nel formaggio finito acquistano forte intensità fino a creare una macchia sul gel la banda principale (39) e le bande minori (al di sopra di essa) appartenenti a *Lactococcus garvieae*. La seconda banda più intensa sotto è ascrivibile al genere *Klebsiella*. La seconda banda più intensa verso il fondo del tracciato non siamo riusciti ad identificarla.

Infine, per quanto riguarda i profili di Mera: i tracciati del latte e della cagliata sono abbastanza simili e si nota più che altro una “ridistribuzione” della popolazione che si

traduce in una variazione di intensità delle bande presenti in entrambe le corse. Molto intensa sia in latte che in cagliata è la banda 1 attribuita ad *Acinetobacter johnsonii*, relativamente intensa in entrambi anche la banda 23 attribuita a *Bacterium G6* che produce anche una seconda banda più in alto (43). Altre bande sono state identificate come *Acinetobacter* o batteri non coltivabili. Nel formaggio dopo 48h notiamo 4 bande molto intense: la 22 e quelle più chiare sopra (56,57) sono tutte state attribuite a *Lactococcus garviae*. La 24 e la 9 sono state attribuite a *Klebsiella*. Nel formaggio di 15 gg la banda più intensa (8) è attribuibile ad *Acinetobacter johnsonii* che produce anche la banda 59 mentre la 51 è da attribuire a *Klebsiella*. Infine nel formaggio di 2 mesi troviamo 3 bande più intense: la 7 attribuita a *Lactobacillus paraplantarum*, la 49 ancora di *Acinetobacter johnsonii* e la 31 (presente anche nel formaggio 15gg) attribuita un batterio non coltivabile.

In base ai risultati ottenuti dal sequenziamento delle bande tagliate possiamo notare come i generi maggiormente ritrovati mediante analisi DGGE siano stati microrganismi gram negativi come *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp. Le bande ascrivibili a tali microrganismi sono state quelle più numerose ed erano presenti in pressoché tutti i campioni. In particolare, per quanto riguarda *Acinetobacter* si è notato come spesso si siano ottenute bande ad altezze diverse appartenenti allo stesso microrganismo: un esempio è fornito da *Acinetobacter* sp. CL1405 le cui bande sul gel (26-40-42) hanno domini di denaturazione differenti pur appartenendo alla stessa specie. Altro esempio è fornito da *Pseudomonas* sp. W1 (bande 6 e 36). Anche il microrganismo gram positivo *Leuconostoc mesenteroides* ceppo LHICA_53_3 ha due domini di denaturazione ad altezze differenti (bande 22 e 38) così come *Lactococcus garviae* ceppo IMAU50094

(bande 56 e 57). Questo fenomeno è descritto in letteratura (91,34,95) e si giustifica con il fatto che alcune specie microbiche possiedono diverse copie dell'operone ribosomale 16S rDNA che possono essere eterogenee nella loro sequenza e dare origine, dunque, a domini di denaturazione differenti che si traducono in più bande per una stessa specie.

Dall'osservazione dei risultati ottenuti dall'analisi DGGE possiamo notare inoltre come in tutti i prodotti e caseifici siano stati identificati generi microbici che mediante gli isolamenti non avevamo ottenuto (paragrafo 4.4). Fra questi sono presenti anche, come atteso, microrganismi non coltivabili. (Tutti i suddetti microrganismi sono indicati in rosso nella tabella 61). Tuttavia, a fronte del ritrovamento di nuovi generi microbici, sorprendentemente, non siamo riusciti a detectare o abbiamo ritrovato con bassissima frequenza nei profili dei campioni alcune specie che erano state frequentemente isolate. Tali isolati, pur tenendo conto della bassa selettività dei terreni colturali, dovevano trovarsi all'interno di essi con ordini di grandezza elevati (10^6 - 10^9 ufc/g). Fra questi un esempio è fornito da *Lactococcus lactis* del quale non è mai stata

rinvenuta una banda in nessuno dei gel effettuati pur avendolo isolato nella maggior parte dei campioni soprattutto nel caseificio di Cangelo. Allo stesso modo *Enterococcus faecalis*, isolato su KEA fino a diluizioni decimali pari a 10^7 , è stato identificato solo con la banda 18 presente solo nel formaggio di Carcoforo ed assente nei profili degli altri caseifici. Gli isolati identificati come *Enterococcus faecalis* a Carcoforo erano stati 33, a Cangelo 11 mentre a Mera 27. A questo proposito in uno studio effettuato da Ercolini *et al.* (2001) (97), gli studiosi misero in evidenza la difficoltà nel detectare la banda di *Enterococcus faecalis* nel profilo DGGE del DNA direttamente estratto dal sieroinnesto utilizzato per la produzione di mozzarella di bufala quando questo microrganismo era stato isolato sul terreno selettivo. Essi supposero che la soglia di *detection* per tale specie microbica fosse superiore a 10^4 ufc/g. Dunque, di fronte alla mancanza di altre specie microbiche frequentemente isolate nei tre caseifici (*Enterococcus faecium* ed *Enterococcus gilvus*) ed alla presenza di altre isolate con minore frequenza (ad esempio *Leuconostoc citreum* e *Leuconostoc mesenteroides*), troviamo conferma di uno dei maggiori limiti dei metodi *culture-independent* ovvero l'amplificazione selettiva già descritta da numerosi autori (81,58,92). Questo limite accomuna tutti i metodi che, come la DGGE, dipendono dalla PCR. Infatti, in un *pool* genomico costituito dal DNA di una comunità vengono preferenzialmente amplificate solo alcune specie microbiche impedendo o accentuando la *detection* di alcuni genotipi (81,82,83,84). Tali distorsioni nell'amplificazione possono essere causate da un disallineamento dei *primers* presso i siti di *annealing* del template di alcuni genotipi; oppure da una più bassa velocità di ibridazione dei *primers* nei confronti di alcuni templati dovuta ad una diversa denaturazione di tale DNA(85,86) nonché la differenza nel numero di copie dell'operone ribosomale possedute da uno specifico microrganismo (47). Tutti questi sono aspetti che riducono l'affidabilità della biodiversità che si osserva in una comunità dopo che essa è stata sottoposta ad amplificazione. Inoltre, nel caso specifico della metodica DGGE bisogna osservare altri aspetti infatti essa pur presentando il vantaggio della possibilità di un sequenziamento diretto delle bande *excise*, l'identificazione può essere ostacolata dal fatto che le piccole dimensioni dei frammenti prodotti di PCR caricate su gel possono non contenere sufficienti informazioni per una precisa classificazione tassonomica (98). E' inoltre necessario considerare il fatto che segmenti genomici aventi diversa sequenza potrebbero avere identica mobilità elettroforetica portando alla comigrazione su gel di diversi frammenti (99). Un altro inconveniente spesso legato alla DGGE è la scarsa riproducibilità (100) determinata dalla preparazione manuale dei gel e dalla colorazione degli stessi oltrechè dalla formazione di aspecifici durante l'amplificazione. Un altro limite associato a tale tecnica è la bassa sensibilità dovuta alle operazioni di colorazione tradizionale effettuate sui gels che può portare alla perdita di bande che rappresentano gli ampliconi quantitativamente meno importanti all'interno della comunità.

5. CONCLUSIONI

In questo lavoro in cui uno degli scopi era la valutazione della qualità microbiologica del formaggio caprino e la caratterizzazione molecolare della popolazione batterica lattica, si è deciso di analizzare le tome provenienti da tre differenti realtà produttive. Le realtà prese in esame sono piccoli caseifici artigianali, a conduzione familiare. Le tecniche produttive adottate sono poco o per niente standardizzate anche a causa delle limitanti condizioni ambientali in cui operano (ubicazione della struttura e agibilità dei locali). Gli operatori, da parte loro, hanno dimostrato grande interesse e disponibilità alla collaborazione al fine di migliorare il processo produttivo.

Le analisi condotte con il primo approccio *culture-dependent* hanno portato alle seguenti conclusioni:

- ✓ i risultati delle conte microbiche non hanno evidenziato, per lo meno a livello qualitativo, differenze sostanziali tra le produzioni;
- ✓ la situazione igienica del latte è apparsa soddisfacente infatti, benché la carica batterica totale superi i valori contemplati dall'attuale normativa, i coliformi fecali (quando presenti) lo erano in modo molto contenuto. Essi infatti sono un tipico indice microbiologico di contaminazione fecale e di stato igienico dei locali di mungitura e lavorazione del prodotto. La loro eventuale presenza in valori elevati nel formaggio finito potrebbe indurre alterazioni indesiderate nella toma caprina;
- ✓ significativo è invece il ritrovamento di *Staphylococcus aureus*, il cui numero non è da considerarsi trascurabile. Esso è un indice microbiologico di contaminazione umana, ma più probabilmente dal momento che è stato ritrovato solo nel latte crudo, la sua presenza può essere attribuita all'animale stesso magari affetto da una mastite subclinica difficile da diagnosticare se a soffrirne è un singolo capo. Questo indice è comunque sicuramente da monitorare in quanto potrebbe essere legato alla produzione di tossine da parte del batterio nel prodotto;
- ✓ la popolazione microbica è rappresentata principalmente da cocchi lattici omofermentanti che, già nel latte di partenza, rappresentano la componente maggioritaria. I batteri lattici svolgono un ruolo importante e prioritario nel conferimento delle caratteristiche qualitative (aroma, gusto, consistenza, colore, ecc.) del prodotto oltre che essere indispensabili per una buona caseificazione del latte in formaggio. Essi contribuiscono anche alla sicurezza igienica dell'alimento grazie all'inevitabile abbassamento del pH dovuto alla fermentazione degli zuccheri

con produzione di acido lattico e alla capacità di alcune specie (*Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum*) di produrre batteriocine contro la *Listeria* spp. e i *Clostridium* spp.;

- ✓ elevata è stata anche la quantità di enterococchi riscontrati soprattutto nelle fasi centrali della caseificazione. Gli enterococchi (*Enterococcus faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* sono le specie più frequentemente isolate) sono dei microrganismi omofermentanti di forma coccica che hanno un ruolo controverso. Essi sono frequentemente presenti nella popolazione batterica di prodotti artigianali dove potenzialmente svolgono un ruolo importante nella determinazione delle proprietà sensoriali, contribuendo a lipolisi e proteolisi oltre che per la sicurezza igienica producendo sostanze inibitorie (batteriocine) verso microrganismi patogeni (*Listeria* sp. e *Clostridium* sp.). Tuttavia la presenza fra queste specie di ceppi responsabili di infezioni nosocomiali, gastroenteriti, endocarditi, talvolta resistenti ad antibiotici e con la capacità di produrre ammine biogene per decarbossilazione di aminoacidi, rendono questo gruppo fonte di preoccupazione. Ragione per cui gli enterococchi, come confermato anche nella nostra indagine molecolare, sono spesso presenti nelle colture per la produzione di formaggi artigianali, ma non vengono commercializzati, come colture starter selezionate;
- ✓ abbondante è il ritrovamento di lieviti e delle Micrococcaceae. La loro presenza non è da ritenersi negativa in quanto caratterizzati da spiccata attività proteolitica e soprattutto lipolitica. Intervengono positivamente sulle caratteristiche sensoriali del prodotto finito. Alcune specie di Micrococcaceae sono pigmentate e contribuiscono alla determinazione dell'aspetto della superficie del formaggio a fine stagionatura.
- ✓ le muffe ritrovate provengono prevalentemente dalla crosta e sono associate alla differente ecologia dei locali di stagionatura. Esse saranno oggetto di uno studio successivo finalizzato a valutarne le specie presenti e l'influenza che esse hanno sulle caratteristiche qualitative del prodotto;
- ✓ il controllo microbiologico dell'ambiente ha dato risultati confortanti.
- ✓ Le prove di identificazione molecolare, a livello di specie, ottenute attraverso il sequenziamento parziale della regione dell'operone ribosomale 16S rDNA, effettuate limitatamente agli Enterococchi ed ai Batteri lattici, hanno permesso di delineare alcune differenze fra le tre produzioni:

- ✓fra gli enterococchi la specie più frequentemente ritrovata, in tutti e tre i caseifici, è stata *Enterococcus faecalis*. Presso l'alpeggio di Mera, in particolare, è stata riscontrata una maggiore variabilità, in quanto sono stati trovati anche *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gilvus* ed *Enterococcus casseliflavus*, quest'ultimo riscontrato solo in questo caseificio;
- ✓fra le forme lattiche a cocco le specie maggiormente riscontrate in tutti e tre i caseifici e in quasi tutte le fasi della lavorazione sono *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus garviae*. Nel latte crudo inoltre si riscontra la presenza di *Leuconostoc mesenteroides*. Nella realtà di Carcoforo nel formaggio a fine maturazione si è osservata la presenza dello *Streptococcus termophilus* e di *Streptococcus parauberis*. Nel caseificio di Cangelo è da sottolineare, soprattutto nel prodotto in stagionatura e in prevalenza sulla crosta, la presenza di *Staphylococcus lentus* e *S. equorum*. Lungo la lavorazione della toma caprina prodotta presso Alpe Mera la popolazione microbica appare decisamente più varia rispetto agli altri due caseifici accanto ai batteri lattici ascrivibili ai generi *Lactococcus* e *Leuconostoc* si rileva infatti la presenza di *Lactobacillus paraplantarum* e *Pediococcus pentosaceus*. Questi ultimi per la loro elevata attività peptidasica e per la capacità di metabolizzare aminoacidi, con produzione di composti aromatici vengono, in prodotti non artigianali, utilizzati come colture aggiuntive per l'accelerazione della maturazione dei formaggi;

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con il secondo approccio *culture-independent* è necessario trarre delle conclusioni per ciascuna delle metodiche utilizzate.

L'analisi LH-PCR delle regioni V2 e V3:

- ✓non ci ha consentito di discriminare fra le diverse specie batteriche presenti all'interno della comunità del formaggio poiché i ceppi puri isolati avevano in tali regioni un'eterogeneità di lunghezza delle sequenze massima di 2 o 3 paia di basi. Ciò non ci ha consentito di costruire un database di riferimento per l'attribuzione dei picchi in comunità poiché tale operazione portava ad assegnazioni non univoche e per stabilire se una specie fosse realmente presente all'interno di un picco si dovevano sempre considerare i risultati degli isolamenti.
- ✓I profili V3 hanno dato un numero maggiore di picchi rispetto ai due profili V2. In generale la regione V2 consente di discriminare meglio tra le specie mentre la regione V3 consente di vedere meglio i generi. Dunque potremmo verosimilmente

affermare che nei nostri campioni vi sia una grande varietà di generi differenti piuttosto che non di specie.

L'utilizzo della tecnica ARISA che studia l'eterogeneità di lunghezza all'interno della regione spaziatrice ha mostrato una situazione totalmente differente rispetto a quella riscontrata in LH-PCR:

- ✓ciascun ceppo amplificato presentava uno o più picchi caratteristici ed i casi di comigrazione non si sono quasi mai verificati: la dimensione dei frammenti ottenuta dall'amplificazione della regione spaziatrice dei ceppi puri variava molto (fra 255 e 561 bp). Questo fatto conferma il fatto che la metodica ARISA rileva le diversità tassonomiche evidenti dalla marcata variabilità esistente nella regione spaziatrice ribosomale all'interno del genoma batterico (62, 115 e 66) poiché essa esplora la diversità microbica a livello intraspecifico (116 e 117). Infatti con questa metodica è stato possibile costruire un database dei ceppi puri isolati utile per la successiva attribuzione dei picchi rilevati in comunità.
- ✓Anche i profili ottenuti dalle comunità hanno presentato un numero di picchi molto più alto rispetto a quelli ottenuti in LH-PCR: ogni campione, infatti, ha dato dai 14 ai 17 picchi. In questo caso molti picchi ottenuti dalle comunità sono stati identificati e l'attribuzione dei picchi ad una specie è stata univoca poiché i picchi comuni a differenti specie sono stati davvero rari e non hanno mai interessato quelli maggioritari.

Per quanto riguarda la tecnica SSCP applicata nuovamente alle regioni ipervariabili V2 e V3 possiamo concludere che:

- ✓anche in questo caso, come era successo con le analisi LH-PCR, i picchi ottenuti dai ceppi puri hanno mostrato diverse comigrazioni sebbene in minor misura infatti i risultati ottenuti dall'analisi elettroforetica degli ampliconi della regione V2 con i coloranti HEX e NED e della regione V3 con il colorante NED hanno permesso di costruire tre database corrispondenti.
- ✓Dalla sovrapposizione dei picchi delle comunità con quelli dei ceppi puri come già visto in LH-PCR si sono potuti identificare molti picchi presenti nelle comunità tuttavia, a fronte di un numero di specie elevato che possono essere identificate con tale metodica, proprio a causa del fenomeno delle comigrazioni l'attribuzione dei picchi non è stata univoca e ci si è dovuti riferire sempre ai risultati ottenuti dagli isolamenti sui terreni culturali. Nei confronti dei quali, però, bisogna sempre tenere

conto dei limiti cui spesso essi sono associati fra i quali la bassa selettività oltre che la difficoltà di isolare specie minoritarie in presenza di specie dominanti.

- ✓ In riferimento al numero dei picchi detectati nelle diverse regioni con i diversi coloranti si osserva come, in generale, in tutti i caseifici il numero di picchi più elevato sia riscontrato sempre nel latte a rappresentare un substrato caratterizzato da una popolazione microbica più composita. Tale valore raggiunge i valori più bassi nel formaggio finito nel quale si vanno a consolidare specie microbiche dominanti.

Per quanto riguarda la tecnica DGGE:

- ✓ possiamo notare inoltre come in tutti i prodotti e caseifici siano stati identificati generi microbici che mediante gli isolamenti non avevamo ottenuto. Fra questi sono presenti anche, come atteso, microrganismi non coltivabili. In base ai risultati ottenuti dal sequenziamento delle bande tagliate osserviamo come i generi maggiormente ritrovati mediante analisi DGGE siano stati microrganismi gram negativi come *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp. Le bande ascrivibili a tali microrganismi sono state quelle più numerose ed erano presenti in pressoché tutti i campioni.
- ✓ Tuttavia, a fronte del ritrovamento di nuovi generi microbici, sorprendentemente, non siamo riusciti a detectare o abbiamo ritrovato con bassissima frequenza nei profili dei campioni alcune specie che erano state frequentemente isolate quali *Lactococcus lactis* ed *Enterococcus faecalis* (detectato solo una volta) oltre che *E. faecium* ed altri batteri lattici. Fatto questo che conferma uno dei maggiori limiti dei metodi *culture-independent* ovvero l'amplificazione selettiva già descritta da numerosi autori (81,58 e 92).

Passiamo ora all'ultimo obiettivo che si era posto nel corso dello studio ovvero quello di valutare l'efficacia nel descrivere un ecosistema microbico complesso come il formaggio di capra dei due approcci:

- *culture dependent* (conte in piastra, terreni selettivi e differenziali, visione al microscopio nonché sequenziamento 16S rDNA degli isolati);
- *culture independent* (estrazione diretta del DNA dalla matrice alimentare e applicazione di tecniche basate sulla PCR).

Nell'effettuare questa valutazione ci soffermeremo su diversi aspetti, primo fra tutti il tipo ed il numero di specie identificate con ciascuna metodica:

- ✓ Con i metodi *culture dependent* abbiamo identificato un numero di specie pari a 26 tuttavia, fra queste, le specie più frequentemente isolate e dunque presenti in quantità maggioritarie sono i batteri lattici.
- ✓ In DGGE recupero specie non rilevate con altre metodiche verosimilmente perché minoritarie e non recuperabili in piastra. Si tratta soprattutto di microrganismi gram negativi ed alcuni non coltivabili. Il numero totale di specie ottenute dopo sequenziamento è stato 22.
- ✓ In SSCP vengono detectate il maggior numero di specie (28), tuttavia, bisogna tenere conto delle comigrazioni che non consentono l'attribuzione univoca dei picchi della comunità ad una sola specie. Dunque per avere una prova effettiva della presenza di uno specifico microrganismo all'interno del latte o del formaggio dobbiamo sempre riferirci ai risultati ottenuti dagli isolamenti.
- ✓ In ARISA, a fronte di un relativamente basso numero di specie detectate (14), tuttavia, l'identificazione è univoca ed interessa sia microrganismi gram negativi che batteri lattici.

Per quanto riguarda la sensibilità dei metodi abbiamo osservato che:

- ✓ I microrganismi che vengono identificati tramite isolamento solo nelle prime fasi del processo produttivo continuano ad essere poi detectati con i metodi *culture independent* nelle fasi successive: si tratta infatti di metodiche che si basano sulla PCR.
- ✓ Le tecniche elettroforetiche quali LH-PCR, ARISA ed SSCP presentano una sensibilità bassa rispetto alle metodiche *culture dependent*. Essa infatti è stata testata nel nostro studio in LH-PCR sia sui ceppi puri che sulla comunità facendo prove di contaminazione con sospensioni microbiche a titolo noto e si attesta intorno a valori di 10^5 cellule.
- ✓ Per contro, i metodi *culture dependent*, pur presentando in termini teorici una sensibilità pari a 10 UFC/g, tuttavia, in presenza di specie microbiche dominanti sul substrato e dunque in piastra, sarà pressoché impossibile isolare le eventuali 10 colonie appartenenti a specie minoritarie.
- ✓ Per quanto riguarda la sensibilità della tecnica DGGE, tenendo conto anche delle distorsioni introdotte dalla PCR, parrebbe fortemente influenzata dalla specie microbica amplificata (97).

Per quanto riguarda i tempi necessari per svolgere le analisi con ciascuna metodica possiamo suddividerli in due categorie ovvero tempi per le operazioni manuali e tempi per l'elaborazione dei dati ottenuti dalle analisi stesse:

- ✓I metodi tradizionali richiedono, come noto, tempi per le operazioni manuali lunghi per l'ottenimento degli isolati, tuttavia, dopo sequenziamento, il tempo necessario per elaborare i tracciati e confrontarli con quelli contenuti all'interno delle banche dati genetiche sono medi e variano, logicamente, in funzione del numero degli isolati.
- ✓La DGGE richiede tempi lunghi più che altro per quanto riguarda le operazioni manuali in quanto la preparazione dei gel è piuttosto laboriosa, tuttavia, l'excisione diretta delle bande ed il sequenziamento portano risultati in tempi relativamente brevi.
- ✓Infine per quanto riguarda le tecniche elettroforetiche LH-PCR, ARISA ed SSCP esse richiedono tempi operazionali brevi mentre i tempi di elaborazione dei dati risultano essere molto lunghi per via della realizzazione dei *database* e della attribuzione dei picchi data dalla sovrapposizione dei profili dei ceppi puri con quelli delle comunità.

Un ultimo aspetto che abbiamo valutato è quello relativo ai costi che derivano dall'impiego di una metodica piuttosto che un'altra.

- ✓I metodi *culture dependent* presentano i costi in assoluto più bassi.
- ✓Le tecniche elettroforetiche invece richiedono investimenti iniziali elevati per via dell'acquisto del sequenziatore e di tutti i polimeri di corsa oltre che dei *markers*.
- ✓La tecnica DGGE invece ha costi medi più che altro relativi all'acquisto degli apparecchi per effettuare la corsa e generare il gradiente di denaturazione. I reagenti utilizzati successivamente hanno costi contenuti.

Alla luce delle conclusioni appena effettuate possiamo affermare che, in generale, non esiste una metodica ideale per la descrizione di una comunità microbica: tutte le informazioni portate da ciascuna tecnica infatti sono complementari e, dati i limiti che caratterizzano ciascuna di esse, bisogna sempre avere cautela nell'interpretazione dei risultati.

In particolare:

- ✓Le analisi tradizionali ci consentono di individuare e quantificare la microflora dominante

- ✓LH-PCR, ARISA e SSCP hanno il pregio di offrire una fotografia, un'istantanea dell'andamento della popolazione nelle diverse fasi produttive e di visualizzare le differenze di composizione in substrati provenienti sia da *step* produttivi diversi che da caseifici diversi.
- ✓DGGE consente di recuperare direttamente da gel microrganismi minoritari e non coltivabili.

Prospettive future di tale lavoro potrebbe essere la creazione di clone libraries soprattutto con la tecnica SSCP al fine di poter identificare picchi delle comunità che sono rimasti non attribuiti. Inoltre sarebbe interessante, sulla base delle specie microbiche individuate con le diverse metodiche, realizzare degli starter che possano apportare un minimo di standardizzazione al processo produttivo per garantirne una maggiore costanza in termini di caratteristiche sensoriali oltre che favorire l'espansione sul mercato di formaggi tipici.

Tale studio ha permesso di ottenere informazioni relative alle caratteristiche microbiologiche di diversi formaggi di capra prodotti da latte crudo che contribuiscono a prevenirne la perdita della biodiversità microbica e a salvaguardarne la tipicità ed il legame con il territorio e la cultura locale.

Queste informazioni sono state raccolte ed ottenute ricorrendo ad un approccio metodologico estremamente ampio dal momento che gli stessi substrati sono stati analizzati con tecniche differenti per ottenerne il maggior numero di informazioni. Tale approccio ha consentito anche di poter effettuare una valutazione comparativa delle differenti metodiche cercando di privilegiare, fra gli altri, aspetti meramente pratici ma che spesso influenzano le scelte dei ricercatori quando si redige un piano sperimentale.

RIASSUNTO

Tra le diverse produzioni alimentari “tradizionali”, un posto di rilievo hanno i prodotti caseari. Questi prodotti si caratterizzano solitamente per l’assenza nel ciclo produttivo di fermenti lattici commerciali o “*starters*” essendo la trasformazione e maturazione del prodotto assicurate dalla popolazione lattica naturalmente presente nel latte. Se da un lato in questo modo vengono assicurati i caratteri sensoriali tipici del prodotto, l’assenza di standardizzazione nel processo produttivo e la peculiarità di ogni singola realtà non garantiscono la possibilità di espansione e modernizzazione di un prodotto e di un processo considerati oggi di “nicchia”. Nelle produzioni casearie artigianali si considera pertanto, con sempre maggiore importanza, la necessità di selezionare ceppi che assicurino le necessarie proprietà tecnologiche, mantenendo inalterate quelle sensoriali garantendo la sicurezza igienico- sanitaria dei prodotti.

Oggetto di questo lavoro è stato, in prima istanza, la valutazione della qualità microbiologica di formaggi ottenuti da latte crudo caprino provenienti da differenti caseifici siti in Valsesia nella provincia di Vercelli. Successivamente si è passati alla caratterizzazione, a livello di specie, dei batteri presenti sul substrato alimentare.

Le analisi sono state effettuate su campioni di prodotto prelevati lungo le fasi di lavorazione a partire dal latte crudo fino al termine della stagionatura; in particolare sono stati ricercati: carica batterica totale, contaminanti, coliformi totali e fecali, batteri lattici totali (cocchi e bastoncini), Enterococchi, Micrococcaceae, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, lieviti e muffe.

Le fasi successive del lavoro possono essere così riassunte:

Isolamento ed identificazione dei ceppi. I ceppi microbici, isolati dai terreni selettivi e differenziali, sono stati sottoposti ad estrazione del DNA e raggruppati in differenti *clusters* a seconda del profilo RAPD (primer universale M13) e ITS (Internal Transcribed Spacer) ottenuti. Uno o più rappresentanti dei gruppi creati sono stati identificati mediante sequenziamento della regione 16S rDNA.

Estrazione DNA dalle comunità. Il DNA totale è stato estratto direttamente dal prodotto al fine di recuperare anche il genoma dei microrganismi minoritari o eventualmente non coltivabili mediante kit commerciale (QIAamp DNA Stool Mini, Qiagen).

Tecniche molecolari/fingerprinting. Inizialmente sono state testate due regioni ipervariabili del gene 16S rRNA (V2 e V3) mediante le metodiche LH (Length-Heterogeneity)-PCR e SSCP (Single Strand Conformation Polimorfism Analysis). Successivamente lo studio della diversità si è rivolto alla regione spaziatrice dell’operone ribosomale per valutare la capacità di discriminare fra le specie batteriche dell’analisi ARISA (Automated Ribosomal Internal Transcribed Spacer Analysis). Per ciascuna di queste tecniche è stato creato un relativo database

dei ceppi puri isolati da terreni selettivi e differenziali. Gli isolati si sono rivelati fondamentali per l'identificazione dei picchi ottenuti nei profili mediante le tre differenti tecniche sopracitate per avere prova della loro effettiva presenza all'interno della comunità. Infine mediante DGGE-PCR (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) sono state studiate le prime tre regioni (V1-V3) del 16S rDNA.

Grazie al confronto con i relativi database precedentemente realizzati è possibile osservare che i picchi delle regioni V2 e, soprattutto V3, hanno mostrato un gran numero di comigrazioni, probabilmente dovute alla bassa eterogeneità di lunghezza in tali regioni fra i batteri presenti nelle comunità. Tali coeluzioni rendono l'identificazione dei picchi poco affidabile. Al contrario, in ARISA, la presenza di picchi comuni a differenti specie è apparsa molto meno frequente e non sembra interessare quelli maggioritari. In questo modo un gran numero di picchi poteva essere univocamente identificato. Questo fatto conferma la capacità della tecnica ARISA di esplorare la diversità microbica a livello intraspecifico evidenziando le diversità tassonomiche nei genomi procariotici dovuta alla marcata variabilità di lunghezza fra le specie batteriche nella regione spaziatrice ribosomale. La tecnica SSCP è apparsa più specifica in quanto ha permesso di rilevare un maggior numero di specie rispetto a quelle ottenute mediante ARISA. Il problema delle comigrazioni sussiste ancora è ma meno accentuato rispetto a quanto osservato nei profili ottenuti in LH-PCR. Infine l'analisi DGGE-PCR ha permesso di identificare specie batteriche mai rinvenute tra i nostri isolati.

Tali risultati hanno sottolineato come lo studio di una comunità non sia possibile attraverso l'impiego di una sola tecnica ma sia indispensabile effettuare un'indagine attraverso l'impiego di più metodiche i cui risultati possano tra loro integrarsi. In particolare le analisi DGGE-PCR e SSCP si sono rivelate le più efficaci per fornire in modo immediato una fotografia sull'evoluzione della popolazione microbica nel corso delle varie fasi produttive del formaggio

BIBLIOGRAFIA

1. Matassino D., Rubino R. 1996. I sistemi produttivi zootecnici nelle aree interne meridionali. La questione agraria. 16: 121-140.
2. Dati FAO 2004 www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp.
3. Faresi R., Greppi G. 2003. Prospettive dell'allevamento caprino. XV° Congresso Nazionale. SIPAOC. pp. 6-8.
4. Benvenuti N. La produzione del latte di capra: aspetti quali - quantitativi. 2000. L'allevatore di ovini e caprini. 2:10-14.
5. Rubino R., Emaldi C., Muscillo F. 1995. La scoperta del latte di capra. Il Vergaro. 3: 23-28.
6. Noè L., Feligni M. 1999. Il latte di capra, un alimento antico. Informatore Zootecnico. 9: 64-66.
7. Cecchi F. 2003. I principali fattori che incidono sui parametri di coagulazione nel latte dei piccoli ruminanti. L'allevatore di ovini e caprini. 2: 6-10.
8. Cattaneo T., Giangiacomo R. 2001. Aspetti rilevanti nella trasformazione casearia del latte di capra e nel recupero del siero. Scienza e Tecnica Lattiero – Casearia. 52(6): 401-406.
9. Marconi S., Manzi P., Santaroni G., Pizzoferrato L. 2002. Dall'allevamento animale all'alimentazione umana: alcuni aspetti della qualità nutrizionale di latte e formaggio caprino. La Rivista di Scienza dell'Alimentazione. 31(2): 157-163.
10. Wehrmuller K., Stephan R. 2007. Prodotti a base di latte di capra e alimentazione. ALP. 28: 1-4.
11. Franzetti L., Pompei M., Scarpellini M., Galli A. 2004. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. Current Microbiol. 49: 255-260.
12. Lazzi C, Rossetti L, Zago M, Neviani E & Giraffa G (2004). Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. J Appl Microbiol 94: 481–490.
13. Brusetti L., Borin S., Mora D., Rizzi A., Raddadi N., Sorlini C., Daffonchio D. (2006). Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. FEMS Microbiol Ecol 56,154–164.
14. Ubertalle A. 2006. Caratteristiche annuarie del latte di capra e variazioni determinate dai fattori zootecnici. Rivista della Società Italiana di Scienze dell'Alimentazione. 9(1): 21-26.
15. Ubertalle A. 1996. Latte di capra: dietetica e alimentazione umana. Il Latte. 11: 56-62.
16. Ubertalle A., Bianchi M. 2000. L'allevamento delle capre per la produzione del latte. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia. 38(1): 33-45.
17. Jenness R. 1980. Composition and characteristics of goat milk. J. Dairy Sci. 63: 1605-1630.
18. Maccabiani G., Pavoni E. 2004. Setting-up of a PCR based method for species identification in milk products [Polymerase Chain Reaction]. Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (Italy). 58: 407-408.
19. Sellami N. S., Badis A., Guetarni D. 2007. Characterisation phenotypic of lactic bacteria isolated from believed milk of goat of two caprine populations local Arabia and Kabyle. Journal of Animal and Veterinary Advances. 6(12): 1474-1481.
20. Zhang WenYi, Yun YueYing, Sun TianSong. 2008. Isolation and identification of dominant microorganisms involved in naturally fermented goat milk in Haixi region of Qinghai, China. Annals of Microbiol. 58(2): 213-217.
21. Bonetta S., Bonetta S., Carraro E. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. Food Microbiology. 25(6): 786-792.
22. Atasoy A. F. 2008. Evaluation of pH change kinetics during different stages of Kashar cheese production from bovine, ovine and caprine milk. J. Food Process. and Pres. 32(3): 416-428.
23. Al-Zahrani S. H., Al-Zahrani F. S. 2006. Production of bacteriocin(s) by four lactic acid bacteria isolated from raw milk on organic waste. World Applied Sciences Journal. 1(2): 135-143.

24. Lima S., Santos M. G. O., Carvalho M. 2006. Microbiological characters in raw and pasteurised goat milk from small dairies in Paraiba. *Higiene Alimentar*. 20(142): 79-84.
25. Katili L. M., Bonassi I. A., Roca R. de O. 2006. Chemicophysical and microbiological aspects of cheese made of a mixed coagulation, ripened by mould using slow or fast frozen goat's milk and slow or fast frozen curd. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 26(4): 740-743.
26. Scintu M. F., Piredda G. 2007. Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research*. 6(1): 221-231.
27. Caridi A., Micari P., Foti F., Ramondino D. 2003. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese *Caprino d'Aspromonte* produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiol*. 20: 201-209.
28. Florez A. B., Lopez-Diaz T. M., Alvarez-Martin P. 2006. Microbial characterisation of the traditional Spanish blue-veined *Cabrales* cheese: identification of dominant lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*. 223 (4): 503-508.
29. Psoni L., Kotzamanidis C., Yiangou M. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol*. 114 (2): 211-220.
30. Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L., 2004. Genbank: update. *Nucleic Acids Res*. 32, D23–D26.
31. Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst.Bacteriol*. 42, 166–170.
32. Palys, T., Berger, E., Mitrica, I., Nakamura, L.K., Cohan, F.M., 2000. Protein coding genes as molecular markers for ecologically distinct populations: the case of two *Bacillus* species. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 50, 1021–1028.
33. Dahllof, I., Baillie, H., Kjelleberg, S., 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol*. 66, 3376–3380.
34. Wang, G.C.-Y., Wang, Y., 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol*. 63, 4645–4650.
35. Ventura, M., Canchaya, C., Meylan, V., Klaenhammer, T.R., Zink, R., 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl. Environ. Microbiol*. 69, 6908–6922.
36. D'Auria, G., Pushker, R., Rodriguez-Valera, F., 2006. IWoCS: analyzing ribosomal intergenic transcribed spacers configuration and taxonomic relationships. *Bioinformatics* 22, 527–531.
37. Mills DeEtta K., Entry J. A., Gillevet P. M., Mathee K., 2007. Assessing Microbial Community Diversity Using Amplicon Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 71,572–578.
38. Mills, D.K., Fitzgerald, C.D. Litchfield, and P.M. Gillevet. 2003. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum contaminated soils. *J. Microbiol*. 54:57–74.
39. Suzuki M, Rappé MS & Giovannoni SJ (1998) Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl Environ Microbiol* 64: 4522–4529.
40. Ritchie, N.J., M.E. Schutter, R.P. Dick, and D.D. Myrold. 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ. Microbiol*. 66:1668–1675.
41. Vestal, J.R., and D.C. White. 1989. Lipid analysis in microbial ecology. *BioScience* 39:535–541.
42. Cavigelli, M.A., G.P. Robertson, and M.J. Klug. 1995. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant Soil* 170:99–113.

44. Hanson, J.R., J.L. Macalady, D. Harris, and K.M. Scow. 1999. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5403–5408.
45. Stephen, J.R., Y.-J. Chang, Y.D. Gan, A. Peacock, S.M. Pfi fner, M.J. Barcelona, D.C. White, and S.J. Macnaughton. 1999. Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a lipid biomarker/polymerase chain reaction–denaturing gradient gel electrophoresis (PCR–DGGE)-based approach. *Environ. Microbiol.* 1:231–241.
46. Glucksman, A.M., H.D. Skipper, R.L. Brigmon, and J.W.S. Domingo. 2000. Use of the MIDI FAME technique to characterize groundwater communities. *J. Appl. Microbiol.* 88:711–719.
47. Hutchinson, G., K. Herrity, H. Malnick, and H.N. Shah. 2000. Long-chain cellular fatty acids; the database and its current applications in microbial SAJ: Volume 71: Number 2 - March–April 2007 identification. *Anaerobe* 6:115–116.
48. Bernhard, A.E., and K.G. Field. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1587–1594.
49. Gatti M., De Dea Lindner J., De Lorentiis A., Bottari ., Santarelli M., Bernini V., Neviani E.(2008). Dynamics of Whole and Lysed Bacterial Cells during Parmigiano-Reggiano Cheese Production and Ripening. *Applied And Environmental Microbiology*, Oct. 2008, P. 6161–6167.
50. Kaplan, C.W., Kitts, C.L., 2003. Variation between observed and true terminal restriction fragment length is dependent on true TRF length and purine content. *J. Microbiol. Methods* 54, 121–125.
51. Pandey, J., Ganesan, K., Jain, R.K., 2007. Variations in T-RFLP profiles with differing chemistries of fluorescent dyes used for labeling the PCR primers. *J. Microbiol. Methods* 68, 633–638.
52. Forney, L.J., Zhou, X., Brown, C.J., 2004. Molecular microbial ecology: land of the one eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 210–220.
53. Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Wade, W.G., 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes encoding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 795–799.
54. Wantabe, K., Kodama, Y., Harayama, S., 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Methods* 44, 253–262.
55. Osborn, A.M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., 2000. An evaluation of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2, 39–50.
56. Hongoh, Y., Yuzawa, H., Okhuma, M., Kudo, T., 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 299–304
57. Chandler, D.P., Fredrickson, J.K., Brockman, F.J., 1997. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Mol. Ecol.* 6, 475–482.
58. Suzuki, M.T., Giovanni, S.J., 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 625–630.
59. Polz, M.F., Cavanaugh, C.M., 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3724–3730.
60. Crosby, L.D., Criddle, C.S., 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *BioTechniques* 34, 790–794, 796, 798.
61. Wang, G.C.-Y., Wang, Y., 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4645–4650

62. Fisher, M. M., and Triplett E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4630–4636.
63. Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H., Jack, T., Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58, 169–188.
64. Scheinert, P., Krausse, R., Ullman, U., Soller, R., Krupp, G., 1996. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S–23S rRNA spacer. *J. Microbiol. Methods* 26, 103–117.
65. Popa R., Popa R., Mashall M.J., Nguyen H., Tebo B.M., Brauer S.(2009) Limitations and benefits of ARISA intra-genomic diversity fingerprinting. *J. Microbiol. Methods* 78, 111–118.
66. Ranjard, L., F. Poly, J.-C. Lata, C. Mougel, J. Thioulouse, and S. Nazaret.(2001). Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,4479–4487.
67. Cardinale M, Brusetti L, Quatrini P, Borin S, Puglia AM, Rizzi A, Zanardini E, Sorlini C, Corselli C, Daffonchio D. (2004). Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6147-6156.
68. Schloss, P.D., Hay, A.G., Wilson, D.B., Walker, L.P., 2003. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 1–9.
69. Cherif H., a Ouzari H., Marzorati M., Brusetti L., Jedidi N., Hassen A., Daffonchio D.(2008) Bacterial community diversity assessment in municipal solid waste compost amended soil using DGGE and ARISA fingerprinting methods. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1159–1167
70. Mateos, M., Markow, T.A., 2005. Ribosomal intergenic spacer (IGS) length variation across the Drosophilinae (Diptera: Drosophilidae). *BMC Evol. Biol.* 5, 46–59.
71. Lin, C.-W., Lai, C.-Y., Chen, L.-H., Chiang, W.-F., (2007). Microbial community structure during oxygen-stimulated bioremediation in phenol-contaminated groundwater. *J. Hazard. Mater.* 140, 221–229.
72. Sliwinski, M.K., Goodman, R.M., (2004). Spatial heterogeneity of crenarchaeal assemblages within mesophilic soil ecosystems as revealed by PCR-singlestranded conformation polymorphism profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1811–1820.
73. Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.J., (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2, 69–78.
74. Leclerc, M., Delbe` s, C., Moletta, R., Godon, J.J., (2001). Single-strand conformation polymorphism of 16S rDNA Archae during start-up of an anaerobic digester. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34, 213–220.
75. Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C. (2003). Bacterial community dynamics during production of Registered Designation of Origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single strand conformation polymorphism analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3840–3848.
76. Saubusse M., Millet L., Delbès C., Callon C., Montel M.C. (2007) Application of Single Strand Conformation Polymorphism — PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116 ,126–135
77. Delbe` s, C., Ali-Mandjee, L., Montel, M.C., (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1882–1891.

78. Hamzeiy, H., Vahdati-Mashhadian, N., Edwards, H.J., Goldfarb, P.S., 2002. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 50 regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat. Res.* 500, 103–110.
79. Wagner, M., Lehner, A., Klein, D., Bubert, A., 2000. Single-strand conformation polymorphisms in the hly gene and polymerase chain reaction analysis of a Repeat Region in the iap gene to identify and Type *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 63, 332–336.
80. Moore, J.E., Stanley, T., Smithson, R., O'Malley, H., Murphy, P.G., 2000. Outbreak of campylobacter food-poisoning in Northern Ireland. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 397–398.
81. Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3417–3418
82. Walsh, P.S., Erlich, H.A., Higuchi, R., 1992. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl.* 1, 241–250.
83. Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S., 2004. PCR-DGGE fingerprints of microbial succession during a manufacture of traditional water buffalo mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* 96, 263–270.
84. Kanagawa, T., 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reaction (PCR). *J. Biosci. Bioeng.* 96, 317–323.
85. Walsh, P.S., Erlich, H.A., Higuchi, R., 1992. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl.* 1, 241–250.
86. Walsh, P.S., Erlich, H.A., Higuchi, R., 1992. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl.* 1, 241–250.
87. Weissensteiner, T., Lanchbury, J.S., 1996. Strategy for controlling preferential amplification and avoiding false negatives in PCR typing. *Biotechniques* 21, 1102–1108
88. Hansen, M.C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S., 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 141–149.
89. Myers, R.M., Fisher, S.G., Lerman, L.S., Maniatis, T., 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13, 3131–3145.
90. Sheffield, V.C., Beck, J.S., Stone, E.M., Myers, R.M., 1989. Attachment of a 40 bp G+ C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 232–236.
91. Ercolini D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food *Journal of Microbiological Methods* 56, 297–314.
92. Ampe, F., Omar, N.B., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.-P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5464–5473.
93. Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., Vaughan, E.E., 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, 1882–1892.
94. Dolci P., Barmaz A., Zenato S., Pramotton R., Alessandria V., Cocolin L., Rantsiou K., Ambrosoli R., 2009. Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *Journal of Applied Microbiology* 106, 278–287
95. Bonetta S., Bonetta S., Carraro E., Rantsiou K., Cocolin L., 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR–DGGE. *Food Microbiology* 25, 786–792
96. Van Hoorde K., Verstraete T., Vandamme P., Huys G., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology* 25, 929–935

97. Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S., 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, 610–617.
98. Øvreås, L., 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* 3, 236–251.
99. Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H., 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23, 1205–1208
100. Powell, S.M., Riddle, M.J., Snape, I., Stark, J.S., 2005. Location and DGGE methodology can influence interpretation of field experimental studies on the response to hydrocarbons by Antarctic benthic microbial community. *Antarctic Sci.* 17, 353–360.
101. Neufeld, J.D., Mohn, W.W., 2005. Fluorophore-labeled primers improve the sensitivity, versatility, and normalization of denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4893–4896
102. Petersen, D.G., Dahllöf, I., 2005. Improvements for comparative analysis of changes in diversity of microbial communities using internal standards in PCR-DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 339–348.
103. Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J., 1999. Optimization of terminal restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518–3525.
104. ISO-International Organization for Standardization. 2003. ISO 4833. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms Colony-Count Technique at 30°C.
105. Hitchins, A. D.; Hartman, P. A.; Tood, E. C. D. 1992. Coliforms: *Escherichia coli* and its Toxins. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*; Vanderzant, C., Splittstoesser, D. F., Eds.; American Public Health Association (APHA): Washington, DC. 325–369.
106. De Man, J. C.; Rogosa, M.; Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130–136.
107. McDonald L.C., McFeeters R.F., Daeschel M.A., Fleming H.P. 1987. A differential medium for the enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(6): 1382-1384.
108. 2007. Kanamicyn Esculine Azide Agar. For the Isolation Differentiation and Enumeration of Enterococci in Foodstuffs, Water and Other Materials. In *Merck Microbiology Manual*, 12th edition; Merck: Darmstadt, Germany. 306.
109. ISO-International Organization for Standardization. 2004. UNI/EN/ISO 6888 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie).
110. ISO-International Organization for Standardization. 2007. EN/ISO 6579 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp.
111. ISO-International Organization for Standardization. 2004. ISO 11290-1 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for the Detection of *Listeria monocytogenes*.
112. El Fantroussi, S., Verschuere, L., Verstraete, W., Top, E.M., 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 982–988.
113. Sass A. M., Sass h., Coolen M. J L., Cypionka H., Overmann J. (2001). Microbial Communities in the Chemocline of a Hypersaline Deep-Sea Basin (Urania Basin, Mediterranean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5392-5402.

114. Garcia-Martinez, J., Bescos I., Rodriguez-Sala J. J., and Rodriguez-Valera F. (2001) RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic Acids Res.* 29, 178–180.
115. Kent, A. D., Triplett E. W. (2000). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. 2002. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 211–236.
116. Cherif, A., S. Borin, A. Rizzi, H. Ouzari, A. Boudabous, and D. Daffonchio. (2003). *Bacillus anthracis* diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 33–40.
117. Daffonchio, D., A. Cherif, L. Brusetti, A. Rizzi, D. Mora, A. Boudabous and S. Borin. (2003). Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5128–5137.
118. Coppola, S., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G., 2001. Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J. Appl. Microbiol.* 90, 414–420.
119. Dewettinck, T., Hulsbosch, W., Van Hege, K., Top, E.M., Verstraete, W., 2001. Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 412–418.