

DETERMINAZIONE RAPIDA CON METODO BIOMOLECOLARE DI BATTERI LATTICI DA LATTE E DERIVATI - RISULTATI PRELIMINARI -

Marri N., Carfora V., Patriarca D., Pietrini P., Filippetti F., Giangolini G., Amatiste S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Key words: lactic acid bacteria, PCR, dairy products

ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) assays were applied for fast and easy identification of some species and subspecies of lactic acid bacteria in milk, thermised milk, curd, cheese, ricotta cheese and yogurt.

INTRODUZIONE

I batteri lattici, rappresentano un gruppo eterogeneo di microrganismi cocchi o bacilli Gram +, catalasi -, microaerofili o anaerobi, appartenenti a numerose specie differenti in grado di produrre acido lattico attraverso vie metaboliche omo ed eterofermentanti (3). I processi enzimatici e di acidificazione, che accompagnano la crescita dei batteri lattici, conferiscono particolari aromi e caratteristiche ad un'ampia varietà di prodotti fermentati come i derivati del latte, della carne e dei vegetali, inoltre tali batteri svolgono un importante ruolo nel controllo della crescita di microrganismi indesiderati (6). Nel latte crudo e nei prodotti lattiero-caseari quali formaggi, yogurt e latte fermentato, i batteri lattici appartenenti soprattutto al genere *Lactobacillus* possono essere naturalmente presenti o aggiunti intenzionalmente (colture starters) per ragioni tecnologiche o per apportare eventuali benefici alla salute del consumatore (3). Considerate le complesse interazioni microbiche che si verificano durante il processo di coagulazione del latte e di maturazione dei formaggi, un'accurata identificazione dei microrganismi coinvolti consente di ottenere informazioni essenziali per comprendere il loro ruolo in questi processi al fine di poter fornire criteri più oggettivi per la selezione dei ceppi batterici utilizzati come starters o colture aggiunte (6). Attraverso lo studio della popolazione batterica naturalmente presente, la caratterizzazione dei prodotti lattiero caseari potrebbe prevenire la perdita di una biodiversità microbica nei prodotti tipici e tradizionali e la conseguente perdita della produzione di una vasta gamma di prodotti lattiero-caseari ottenuti con diversi metodi, le cui caratteristiche intrinseche dipendono direttamente dalle tradizioni regionali e locali e dalla popolazione microbica autoctona presente nel latte crudo e selezionata dall'ambiente di lavorazione del prodotto (4). L'identificazione dei batteri lattici basata sull'analisi delle caratteristiche fenotipiche si è dimostrata spesso lunga e difficoltosa per diverse ragioni. Innanzitutto, la valutazione dell'aspetto morfologico delle colonie cresciute sui terreni di coltura specifici attualmente in uso non consente di effettuare un'analisi completa e realmente discriminante di tutta la popolazione microbica presente in quanto colonie batteriche appartenenti a specie differenti possono mostrare un aspetto molto simile, viceversa colonie appartenenti alla stessa specie batterica possono apparire morfologicamente differenti; a tal proposito i passaggi di purificazione delle colonie e la successiva tipizzazione biochimica possono risultare non sempre esaustivi. È inoltre opportuno considerare la presenza di una grande variabilità dei profili di fermentazione dei microrganismi che differiscono considerevolmente anche per ceppi batterici appartenenti alla stessa specie (6) come

anche le esigenze nutrizionali e di crescita poco selettive per le diverse specie (4). Negli ultimi anni lo sviluppo di tecniche biomolecolari ha aperto nuove prospettive per la caratterizzazione dei batteri lattici, consentendo di distinguere specie microbiche fenotipicamente simili ma anche di individuare ceppi batterici appartenenti alla stessa specie (6). Scopo del presente lavoro, è lo sviluppo di un metodo biomolecolare, in via di validazione, per l'identificazione rapida di alcune delle specie e sottospecie di batteri lattici presenti nel latte e in derivati del latte di origine bovina, bufalina e ovi-caprina.

MATERIALI E METODI

Da Gennaio a Luglio 2011 sono stati analizzati 11 campioni di latte crudo, 4 di latte termizzato e diverse tipologie di prodotti lattiero-caseari provenienti da aziende localizzate nella regione Lazio: 5 cagliate, 17 formaggi (freschi, stagionati e a pasta filata), 2 ricotte, 7 yogurt bianchi e 4 yogurt alla frutta per un totale di 50 campioni. Di questi, 11 campioni appartenenti alla specie bovina, 16 di origine bufalina, 20 ovi-caprini e 3 di tipologia mista. Una volta prelevati, sono stati conservati ad una temperatura di 4°C e sottoposti alle analisi di laboratorio entro 24 ore dal loro arrivo. Sono state allestite diluizioni 1:10 in acqua peptonata dalle matrici liquide e da quelle solide, da cui sono state effettuate delle subcolture trasferendo 1 ml della diluizione 1:10 in 9 ml di M17 broth e MRS broth (De Man, Rogosa and Sharpe broth) utilizzati rispettivamente per la ricerca di lattococchi e lattobacilli. Dopo incubazione di 24-48 ore a 37°C in aerobiosi per le brodocolture di M17 broth e in anaerobiosi per le brodocolture di MRS broth, il DNA è stato estratto nel modo seguente: 1 ml di ogni brodocoltura è stato centrifugato a 7500 rpm per 10 minuti, dopo aver eliminato il surnatante il pellet è stato risospeso in 1 ml di acqua distillata sterile e nuovamente centrifugato. Dopo aver eliminato il surnatante, si è proseguito all'estrazione del DNA genomico a partire dal pellet batterico utilizzando il kit di estrazione Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Il DNA così ottenuto è stato sottoposto ad analisi in PCR, utilizzando i primers e le condizioni di reazione riportati in letteratura per l'identificazione di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4), *Streptococcus thermophilus* (4), *Enterococcus faecalis* (6), *Lactobacillus plantarum* (6), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (7), *Lactobacillus helveticus* (5) e, solo per i campioni di origine bufalina, *Lactobacillus paracasei* (4). Per ogni reazione di PCR è stato utilizzato come controllo positivo il DNA appartenente a ceppi batterici di riferimento certificati (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e il DNA di ceppi batterici appartenente ad una collezione fornita dall'Istituto Superiore di Sanità. Gli amplificati, ottenuti tramite l'utilizzo di GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems), sono stati esaminati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1,2% contenente Gel Red in tampone Tris-acetato-EDTA 1X e visualizzati con transilluminatore.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I batteri lattici identificati tramite PCR, correlati alla tipologia di matrice e alla specie animale di provenienza, sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1 –Batteri lattici identificati tramite PCR

Matrice	Specie animale	Batteri lattici identificati tramite PCR
Latte crudo	bovina	<i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>E. faecalis</i>
Latte termizzato	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Cagliata	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>S. thermophilus</i> ; <i>E. faecalis</i>
Formaggio	bufalina	<i>Lb. paracasei</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Str. thermophilus</i> ; <i>E. faecalis</i>
	bovina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
	ovina	<i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	caprina	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>S. thermophilus</i> ; <i>E. faecalis</i>
	mista	<i>Lb. plantarum</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Ricotta	caprina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Yogurt	bovina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>S. thermophilus</i>
	caprina	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. plantarum</i> ; <i>S. thermophilus</i>

I dati preliminari mostrano come questo metodo biomolecolare (in corso di validazione) applicato alle diverse tipologie di matrici lattiero-casearie finora analizzate, risulta efficace per l'identificazione delle specie e delle sottospecie di batteri lattici sopracitate. Tale metodica sembra consentire un'efficace identificazione della flora lattica in esame in tempi brevi e con maggiore facilità rispetto ai tradizionali metodi di identificazione fenotipica. Tale affermazione dovrà essere supportata dall'esecuzione di ulteriori prove analitiche al fine di completare la validazione del metodo e dallo sviluppo di nuove tecniche biomolecolari per l'identificazione di altre specie e sottospecie microbiche, per ampliare la caratterizzazione del numero di specie di batteri lattici presente nei prodotti in esame. Consapevoli dell'esistenza di altri metodi biomolecolari a disposizione per lo stesso scopo, tra cui la PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (2), le tecniche ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) (1) e RAPD (random amplified polymorphic DNA) (7), si ritiene che l'applicazione della PCR tradizionale costituisca uno strumento molto utile e affidabile per lo studio della flora lattica dei prodotti lattiero-caseari.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Aquilanti L., Silvestri G., Zannini E., Osimani A., Santarelli S., Clementi F. Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. 2007. Journal of Applied Microbiology **103**. 948–960
- 2) Bonetta S., Bonetta S., Carraro E., Rantsiou K., Coccolin L., 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR– DGGE. Food Microbiology **25**. 786– 792.
- 3) Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J., 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait **83**. 269–306.
- 4) Fortina G.M., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manichini P.L., 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food Microbiology **20**, 397-404 .
- 5) Fortina G.M., Ricci G., Mora D., Parini C., Manichini P.L., 2001. Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. FEMS Microbiology Letters. **198**, 85-89.
- 6) Martin-Platero A.M., Valdivia E., Maqueda M., Martín-Sánchez I., and Martínez-Bueno M., 2008. Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. Applied And Environmental Microbiology, **74**, 5662–5673.
- 7) Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F., Use of PCR-Based Methods for Rapid Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* .Applied and Environmental Microbiology, 1999, p. 4351–4356.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Anna Maria Ferrini del Reparto Microrganismi e Tecnologie Alimentari, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, per i materiali di riferimento forniti.