



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

L'ATTIVITA' DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA: *PRINCIPALI RISULTATI E LORO TRASFERIBILTA' OPERATIVA*

**Valutazione delle caratteristiche di probioticità di
ceppi di batteri lattici isolati in prodotti tradizionali**



Roma, 20 Giugno 2017

Dott.ssa Bianca Maria Varcasia





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Progetto LT08/10: Valutazione delle caratteristiche di probioticità di ceppi di batteri lattici isolati in prodotti alimentari tradizionali

SCOPO



Studiare la flora lattica presente nei prodotti tradizionali fermentati a base di latte crudo



Sviluppare un sistema di caratterizzazione dei batteri lattici, potenzialmente probiotici, presenti nelle flore lattiche isolate

FASI



- Studio e scelta dei prodotti tradizionali
- Campionamento dei prodotti
- Isolamento, caratterizzazione e purificazione dei ceppi di lattobatteri
- Esecuzione delle prove di probioticità *in vitro*
- Caratterizzazione molecolare dei ceppi mediante metodi molecolari
- Creazione della ceppoteca
- Esecuzione delle prove *in vivo*



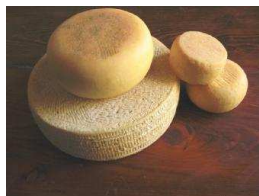
PRODOTTI

Pecorino di Picinisco (Caseificio Pia Marcello)



Formaggio a latte crudo ed a pasta cruda, con aggiunta di caglio ovino in pasta. È prodotto da latte ovino di pecore di razza Sopravvissana, Comisana, Massese e loro meticci con aggiunta di piccole quantità di latte di capra delle specie Capra Grigia Ciociara, la Bianca Monticellana e la Capestrina

Caciotta di capra (ABCHEESE DI BRENT ZIMMERMAN &C.)



Formaggio stagionale a crosta lavata, prodotto con latte crudo di capra di razza Camosciata delle Alpi e caglio liquido bovino

Caprino di Scilla (Azienda Agricola Saba)



Formaggio a base di latte crudo caprino, preparato con caglio di origine animale senza l'aggiunta di starter microbici

Pecorino della Montagna Pistoiese (Azienda Agricola La Buca)



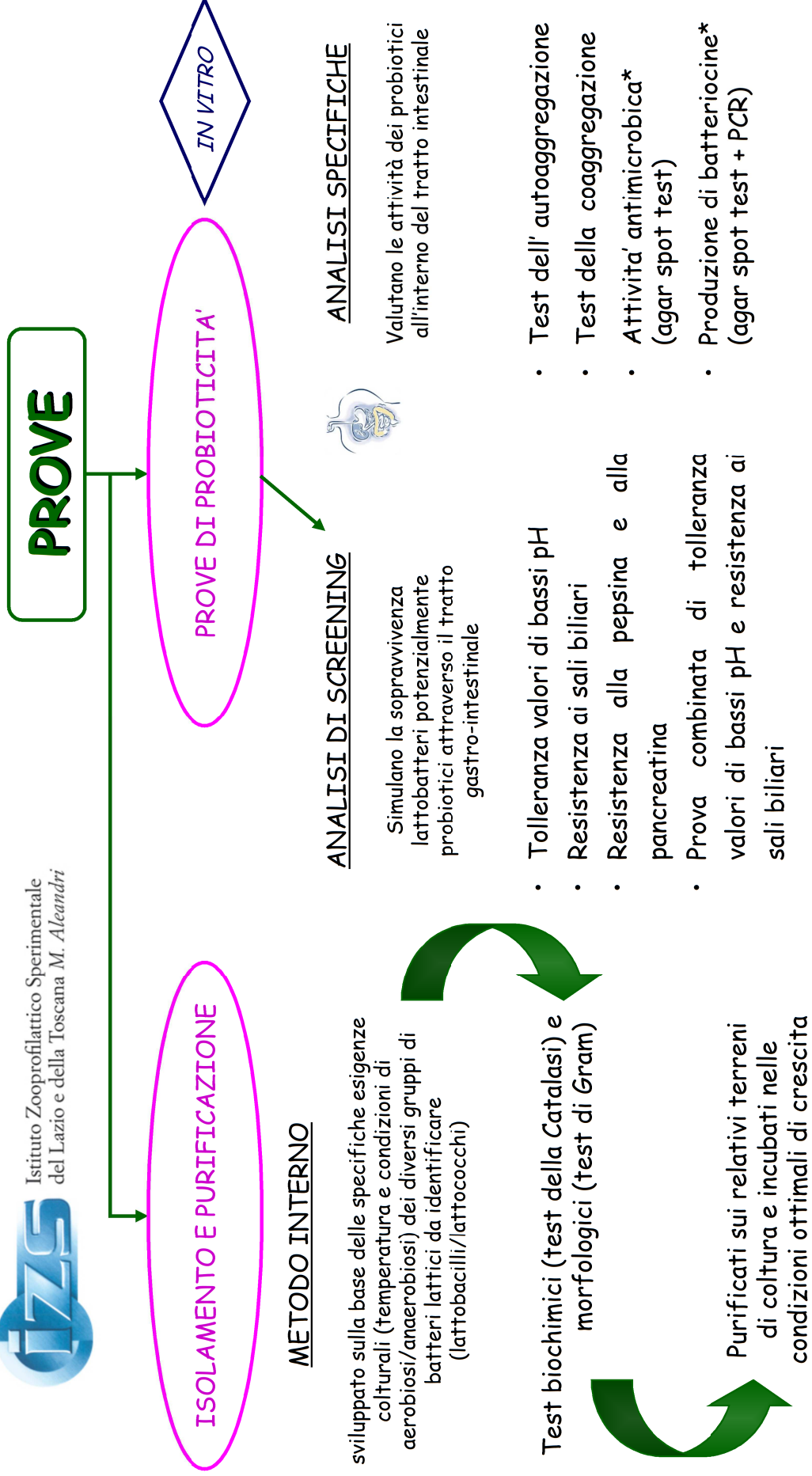
Formaggio stagionato a base di latte crudo di pecora, esclusivamente razza Massese, prodotto nella zona dell'Appennino pistoiese e caglio di origine animale (ovino)

Provolone di bufala (Caseificio Ventre Daniele)



Formaggio a pasta filata, prodotto esclusivamente con latte di bufala, può essere prodotto in diverse forme (cilindrica, sferica o a pera), generalmente contenuto in reti di corda o di giunco





* Agar spot test: tecnica che permette di valutare l'attività antimicrobica grazie alla sola produzione di batteriocine o sostanze batteriocine-like





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PROVE

PROVE DI PROBIOTICITA'



IN VIVO

VALUTAZIONE DELLA COLONIZZAZIONE INTESTINALE (Pavan et al., 2003)

Somministrazione giornaliera del ceppo probiotico (10^9 ucf/ml) al gruppo target per 10 giorni e prelievo giornaliero delle feci, prima della somministrazione, per l'identificazione molecolare del ceppo

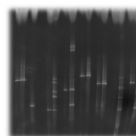
VALUTAZIONE DELLA STIMOLAZIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO (METODO INTERNO)

Valutazione dell'indice di stimolazione delle cellule della milza ad opera del mitogeno (concanavalina A), prelevate dal gruppo target

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE

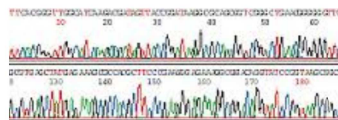
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Tecnica elettroforetica utilizzata per separare frammenti di DNA in base alle loro differenti proprietà di dissociazione o "melting" sfruttando un diverso gradiente di concentrazione del gel di acrilammide. Prima di effettuare l'elettroforesi, è necessario amplificare, mediante tecnica PCR end point, la regione V1 del 16S rRNA utilizzando oligonucleotidi primers specifici



SEQUENZIAMENTO

Tecnica che permette di ricostruire l'ordine delle basi azotate che si susseguono all'interno di un tratto di DNA relativo alla regione V1 del 16S rRNA. La sequenza ottenuta viene confrontata con quella presente nelle banche dati di riferimento; l'appartenenza ad una specie viene fatta sulla base della maggiore omologia genetica.

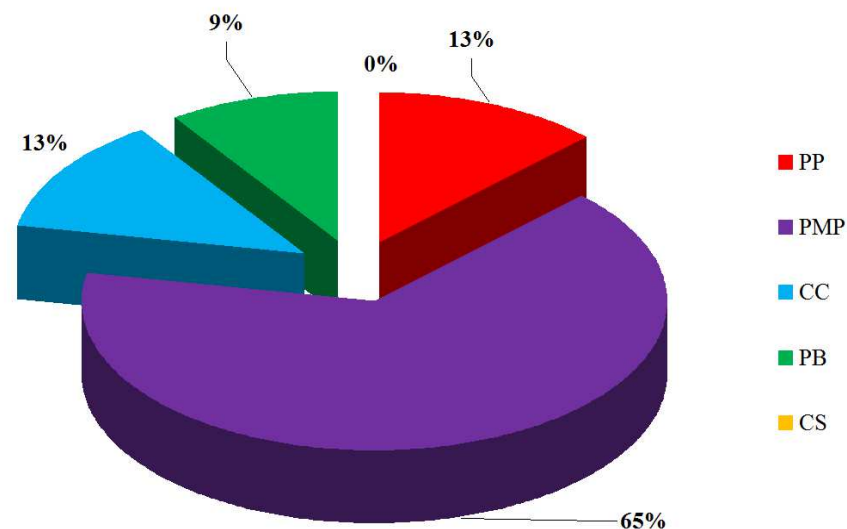
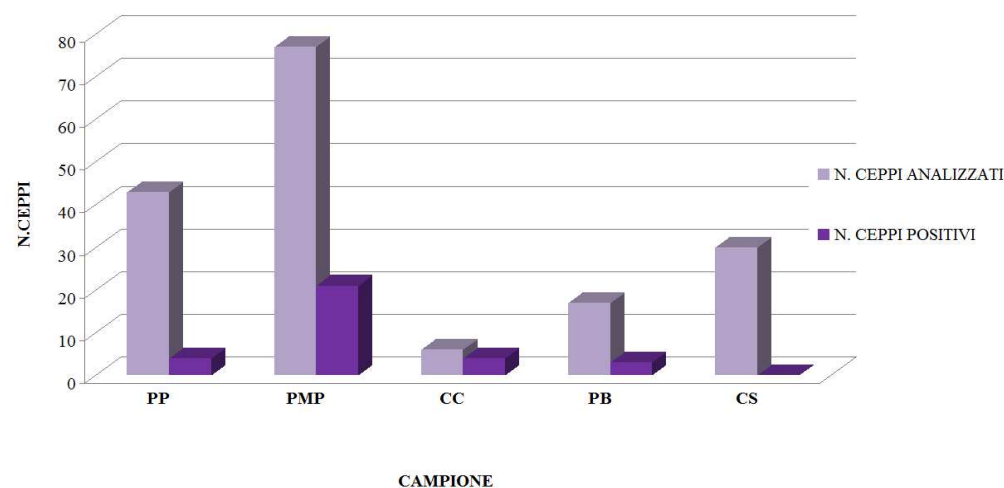


RISULTATI

PRODOTTO	CEPPI ANALIZZATI	CEPPI NEGATIVI	CEPPI POSITIVI	
			FREQUENZA ASSOLUTA	PERCENTUALE
Pecorino di Picinisco (PP)	43	39	4	13
Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP)	77	57	20	64
Caciotta di Capra (CC)	6	2	4	13
Provolone di Bufala (PB)	17	14	3	10
Caprino di Scilla (CS)	30	30	-	-
TOTALE	173	142	31	100



Frequenza assoluta e distribuzione percentuale dei ceppi di LAB positivi per le prove di probioticità



Identificazione molecolare

PRODOTTO	N. CEPPI TOTALI	SPECIE	N. CEPPI
Pecorino di Picinisco	4	<i>Lactococcus lactis</i> sub. <i>lactis</i> <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Lactobacillus casei</i>	2 1 1
Pecorino della Montagna Pistoiese	20	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> N.D.	15 1 4
Caciotta di Capra	4	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Enterococcus</i> spp. N.D.	2 1 1
Provolone di Bufala	3	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Enterococcus</i> spp.	2 1
Caprino di Scilla	-	-	-



Progetto: Ottimizzazione l'impiego dei residui del caseificio nell'alimentazione dei ruminanti

SCOPO



Studiare le caratteristiche igienico-sanitarie del siero, della scotta e della miscela siero-scotta (50/50 v/v) mediante analisi microbiologiche per individuare i punti critici e attuare eventuali azioni correttive

FASI

Studio della microflora patogena e non della miscela siero-scotta

Studio della cinetica di acidificazione della miscela siero-scotta

Individuazione del ceppo altamente acidificante e preparazione dell'inoculo

Prelievi della miscela a T_0 e dopo 48 h di lavorazione (n.4 prelievi: n. 2 stagione invernale e n.2 stagione estiva)

Prove della cinetica di acidificazione su miscela con e senza inoculo





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

PROVE

PROVE MISCELA

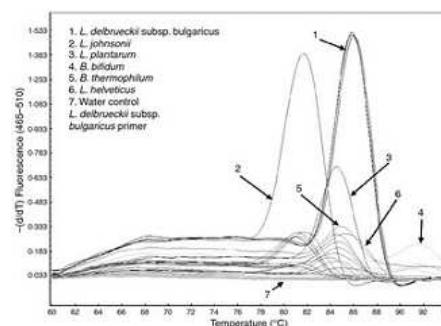
PROVE DI
CINETICA DI
ACIDIFICAZIONE
CON E SENZA
INOCULO

PROVE MICROBIOLOGICHE

PROVE MOLECOLARI

- COLIFORMI [ISO 4832:2006]
- LIEVITI A 25°C (AW>0.95) [ISO 21527-1:2008]
- MICRORGANISMI TOTALI A 30°C [UNI EN ISO 4833-1:2013]
- MUFFE A 25°C (AW>0.95) [ISO 21527-1:2008]
- PSEUDOMONAS SPP. [ISO/TS 11059/IDF/RM 225:2009]
- STAFILOCOCCI COAG.POS. [ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003]
- ISOLAMENTO E PURIFICAZIONE LATTOBATTERI [Metodo interno]
- TEST BIOCHIMICI (TEST DELLA CATALASI) E MORFOLOGICI (TEST DI GRAM) [Metodo interno]
- PREPARAZIONE INOCULO CON CEPPO DI *Lactobacillus helveticus* [Metodo interno]

- IDENTIFICAZIONE LATTOBATTERI: HRM (High Resolution Melting) [Metodo interno]



- MULTIPLEX PCR per l'identificazione del *Lactobacillus helveticus* [Metodo interno]
- RT PCR SALMONELLA E LISTERIA [Protocollo Baseline]
- RT PCR E.coli STEC [ISO/TS 13136:2012 (E)]
- RT PCR E. coli enteroaggregativi [Protocollo EU RL_Method_05_Rev 1]



- ASSENZA DI MICRORGANISMI PATOGENI RELATIVI E NON AI CRITERI MICROBIOLOGICI (Reg. (CE) n. 2073/2005)
- L'INNESTO NELLA MISCELA SIERO-SCOTTA DI UNA NOTA QUANTITA' DI *Lactobacillus helveticus* FAVORISCE UNA MAGGIORE VELOCITA' DI ACIDIFICAZIONE, SOPRATTUTTO NELLA STAGIONE INVERNALE
- CEPPI DI LATTOBATTERI CARATTERIZZATI MEDIANTE ANALISI MOLECOLARE SONO:
 - ✓ *Lactobacillus helveticus*
 - ✓ *Lactobacillus sakei*
 - ✓ *Weissella confusa*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

