



Identificazione di specie microbiche in alimenti e ambiente

27 ottobre 2021

Maria Laura De Marchis/Bianca Maria Varcasia

UOC Microbiologia degli Alimenti



Piano annuale di sviluppo 2020 dell'IZSLT

Quattro linee prioritarie di sviluppo scientifico e tecnologico:

1. Studio dei batteriofagi applicato al controllo delle contaminazioni e delle infezioni batteriche
2. Studio e sviluppo di attività in materia di sostenibilità ambientale ed economia circolare nelle produzioni zootecniche: il ruolo dell'allevamento di insetti;
3. **Studio dei microbiomi/microbioti**
4. Studio delle risorse satellitari come strumento per il monitoraggio sanitario ed il precision farming

→ Impiego delle tecnologie di Next Generation Sequencing e del metabarcoding per indagare con maggior chiarezza la qualità delle produzioni nella filiera agroalimentare

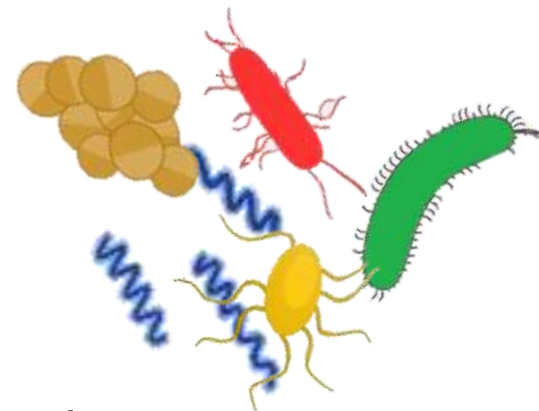


ALCUNE DEFINIZIONI

MICROBIOTA

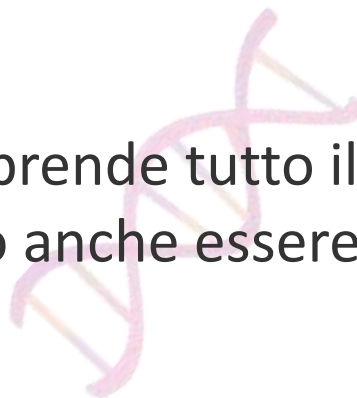
Il microbiota rappresenta l'intera collezione di microrganismi di una specifica nicchia.

Es: microbiota dell'intestino umano



MICROBIOMA

Il microbioma comprende tutto il materiale genetico compreso nel microbiota. Può anche essere definito come il metagenoma del microbiota



Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. Berg G, et al. Microbiome. 2020.



ATTIVITA' DI RICERCA

Progetto di ricerca corrente IZS 04/20 RC

Ecosistema microbico nell'industria alimentare: caratterizzazione del microbioma di filiere produttive territoriali con metodiche di sequenziamento di nuova generazione.

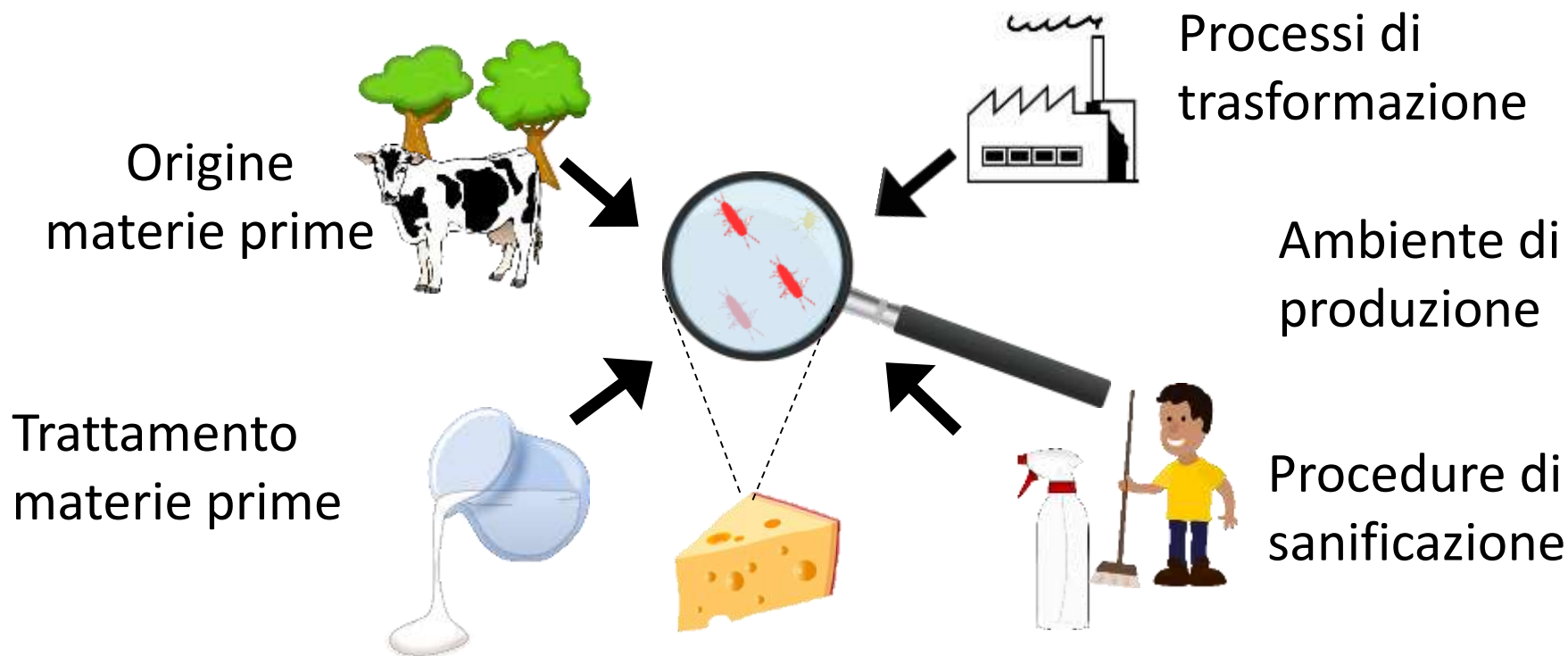
N. identificativo	Ente appartenenza	Responsabile scientifico
U.O.1 IMS	IZSLT	Maria Laura De Marchis
U.O.2 IMS	IZSLT	Paola De Santis
U.O.3 IMS	IZSLT	Roberto Condoleo
U.O.4 IMS	IZSLT	Maria Concetta Campagna
U.O.5 IMS	IZSLT	Matteo Senese
U.O.6 EMS	ARSIAL	Miria Catta

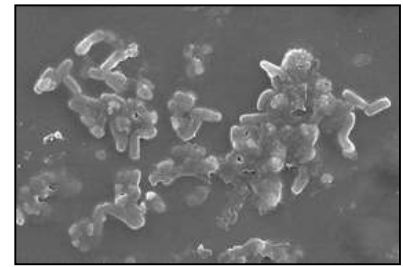


RAZIONALE

Filiera produttiva degli alimenti → ecosistema microbico complesso ed eterogeneo.

La flora microbica di un alimento è influenzata da numerosi fattori intrinseci, determinati dal processo di produzione, e di fattori estrinseci, complessivamente riconducibili all'ecosistema microbico della produzione e ai necessari processi di sanificazione





PROCEDURE DI SANIFICAZIONE

- Possono imprimere una pressione selettiva sulla flora ambientale e, conseguentemente, sulla flora lattica che naturalmente compete e protegge dallo sviluppo di agenti patogeni alimentari
- Possono favorire, in determinate condizioni, la persistenza di popolazioni batteriche potenzialmente patogene → BIOFILM

BIOFILM

- Il biofilm si definisce come un aggregato di cellule batteriche incluse in una matrice polisaccaridica
- Si sviluppano solitamente nei punti difficilmente raggiungibili (es: parti meccaniche non ispezionabili nell'industria alimentare)
- Favoriscono l'adesione di specie patogene, quali ad esempio *L. monocytogenes*, e ne possono aumentare la resistenza ai disinfettanti
- All'interno dei biofilm i batteri possono rimanere vitali ma non essere coltivabili



OGGETTO DI STUDIO



MICROBIOMA DEI PRODOTTI FERMENTATI E DEL LORO AMBIENTE DI PRODUZIONE



CONOSCENZE PREGRESSE SULL'ARGOMENTO

Cosa è stato fatto finora in questo settore:

- isolamento con metodiche colturali classiche e analisi molecolare degli isolati:
 - DGGE (Elettroforesi su gel a Gradiente denaturante)
 - T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - LH-PCR (Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction)

Associate talvolta a sequenziamento classico con metodica Sanger del marcatore 16S

- Numerosi studi di HTS su prodotti fermentati ma spesso associati soltanto al marcatore 16S (pochi dati sull'identificazione di specie micotiche)

De Filippis F, Parente E, Ercolini D. Metagenomics insights into food fermentations Microb Biotechnol. 2017 Jan;10(1):91-102.



OBIETTIVI

- Caratterizzazione complessiva del microbioma di **specie batteriche** e **specie micotiche** in nuovi prodotti fermentati
- Identificazione di **specie potenzialmente patogene** negli alimenti e nell'ambiente con un approccio globale e che consenta di mettere in evidenza la presenza di **specie non coltivabili o presenti in tracce** → metodica coltura indipendente
- Caratterizzazione delle specie tecnologicamente utili presenti nell'**ambiente** e nel **prodotto finito** (es: confronto con gli starter commerciali impiegati nel processo di produzione)



OUTCOME:

- Valutazione del **livello di sicurezza microbiologica** dei prodotti esaminati ed eventuali proposte di **interventi di miglioramento dei processi di produzione** e dei **protocolli di sanificazione**;
- **Valorizzazione dei prodotti tradizionali e tipici delle due regioni Lazio e Toscana**, con possibilità di applicare i protocolli sviluppati ad altre matrici affini a quelle considerate;
- Possibilità di utilizzo dei dati analitici da parte degli stabilimenti **per integrare i piani di autocontrollo aziendale**.



COSA INTENDIAMO REALIZZARE

- Piano di campionamento alimentare ed ambientale specifico per le matrici e gli stabilimenti selezionati
- Messa a punto di una **metodica di sequenziamento massivo** (NGS) per l'identificazione di **specie batteriche e micotiche in matrici alimentari e campioni ambientali**
- Applicazione del saggio in NGS e di un pannello specifico di analisi microbiologiche classiche ai campioni raccolti ed il confronto tra i dati ottenuti in rapporto alla **tipologia di prodotto**, alla **procedura di produzione** e ai **protocolli di sanificazione** adottati dai diversi stabilimenti.



ATTIVITA' PRELIMINARI

- Selezioni dei prodotti fermentati (territorio Lazio e Toscana)
- Selezioni degli stabilimenti
- Sopralluoghi per visionare l'ambiente ed il processo di produzione
- Somministrazione di questionari che consentano di mettere in evidenza variabili legate ai processi di produzione e ai processi di sanificazione
- Definizione di un piano di campionamento alimentare e ambientale
- Definizione del pannello di analisi microbiologiche da applicare alle matrici selezionate



CRITERI DI SELEZIONE:

- Prodotti fermentati
- Prodotti nel territorio laziale e toscano
- A marchio o PAT (con disciplinare di produzione o con richiesta in corso)



FINOCCHIONA IGP
Toscana

2 stabilimenti

UO 5



FIOR DI LATTE DELL' AGRO PONTINO
Lazio

4 stabilimenti

UO 1

UO 4

UO 6





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

STRUTTURAZIONE DEL QUESTIONARIO

pag. 1 di 3

IZS

Progetto di ricerca corrente - Ecosistema microbico nell'industria alimentare; caratterizzazione del microbioma di filiere produttive territoriali con metodiche di sequenziamento di nuova generazione

QUESTIONARIO PER AZIENDA AGRO-ALIMENTARE

Azienda/Stabilimento

Nome/Ragione Sociale: _____

Indirizzo: _____

Telefono: _____ Fax: _____

E-mail: _____ sito web: _____

P.E.C.: _____

Titolare/Responsabile: _____

Dati anagrafici per il progetto di ricerca: _____

Prodotto oggetto della ricerca

Nome del prodotto: **Salume Finocchiona IGP**

Quantità annua prodotta: _____ kg

Produzione: ☐ tutto l'anno ☐ solo periodi dell'anno (specificare): _____

☐ casario (specificare): _____

Vendita: Ingrosso ☐

Dettaglio ☐ Vendita diretta ☐ Punti di vendita esterni ☐

Lo stabilimento produce altre tipologie di prodotti: ☐ sì ☐ no ☐

Se sì specificare: _____

La produzione della Finocchiona avviene in: quali condizioni con gli altri prodotti?

Se sì specificare: _____

Processo di produzione

Carne appaia:
Razza: ☐ Large White Italiano ☐ Livornese Italiano ☐ Indio
Provenienza: ☐ aziendale ☐ altre aziende italiane* ☐ aziende estere*
*Indicare gli stabilimenti di provenienza: _____

Tagli di carne:
Spalla: _____ %
Pancetta: _____ %
Magra di pancetta e di gola: _____ %
Fetture di prosciutto: _____ %
Altre: _____ %

Ingredienti aggiunti (per 100 kg di carne):
Sale: _____ kg
Pepe macinato: _____ g, in grani: _____ g
Aglio: _____ g
Semi di finocchio: _____ g
Menta ☐ sì ☐ no
Nero ☐ sì ☐ no
Acido L-ascorbico ☐ sì ☐ no
Sodio L-ascorbato ☐ sì ☐ no
Destrosio ☐ sì ☐ no
Saccharina ☐ sì ☐ no
Fruttosio ☐ sì ☐ no
Lattosio ☐ sì ☐ no
Vino ☐ sì ☐ no (specificare): _____, ☐ no
Insieme di batteri lattici ☐ nessuno (filare aziendale) ☐ starter commerciali (specificare): _____

Insaccato:
Diametro (in bruciatore): _____ cm
Bustello ☐ naturale ☐ forato
Legatura: ☐ stringa ☐ rete
Tipologia di insaccato: ☐ manuale
Peso unitario all'insacco: _____ kg
Dimensione: lunghezza: _____ cm, diametro: _____ cm
Assaiogebato
Temperatura: _____ °C, Uff: _____ %, Tempo: _____ g
Stagionatura
Temperatura: _____ °C, Uff: _____ %, Tempo: _____ g
Prodotto finito: lunghezza: _____ cm, diametro: _____ cm, peso: _____ kg
Confezionamento: ☐ prodotto intero ☐ in tranci ☐ affettato
sottovuoto ☐ atmosfera protettiva ☐

pag. 2 di 3

A) Superfici a contatto con alimenti:
Sanificazione eseguita in fase: Pre-operativa ☐ Post-operativa ☐

Igienizzazione (prelievi):
Denominazione detergente: _____
Numero di igienizzazioni giornaliere: _____
Numero di igienizzazioni settimanali: _____
Disinfettante:
Rotazione dei disinfettanti: ☐ no
Tipologia e Nome del prodotto utilizzato: _____
Rotazione dei disinfettanti: ☐ sì
Denominazione disinfettante 1): _____
Denominazione disinfettante 2): _____
Denominazione disinfettante 3): _____
Programma di rotazione:
Intervallo di tempo tra i trattamenti per ciascun disinfettante (in numero settimanali, nel quaternario settimanale 1, 2, 3, 4): _____

B) Superfici NON a contatto con alimenti:
Sanificazione eseguita in fase: Pre-operativa ☐ Post-operativa ☐

Igienizzazione (prelievi):
Denominazione detergente: _____
Numero di igienizzazioni giornaliere: _____
Numero di igienizzazioni settimanali: _____
Disinfettante:
Rotazione dei disinfettanti: ☐ no
Tipologia e Nome del prodotto utilizzato: _____
Frequenza della sanificazione: _____
Rotazione dei disinfettanti: ☐ sì
Denominazione disinfettante 1): _____
Denominazione disinfettante 2): _____
Denominazione disinfettante 3): _____
Programma di rotazione:
Intervallo di tempo tra i trattamenti per ciascun disinfettante (in numero settimanali, nel quaternario settimanale 1, 2, 3, 4): _____

Presso lo stabilimento sono adottate altre procedure di sanificazione degli ambienti? (per trattamento termico, trattamento con raggi UV, ...) ☐ sì ☐ no
Se sì, specificare il tipo di trattamento e dove esso viene applicato: _____

VARIABILI
PROCESSO DI
PRODUZIONE

VARIABILI
PROCEDURE DI
SANIFICAZIONE



I sopralluoghi



- Analisi dell'intero processo di produzione
- Definizione del calendario dei prelievi (10 prelievi alimentari nell'arco di un anno)
- Selezione dei punti ambientali (5 o 6 punti a seconda dello stabilimento) da campionare per 3 volte durante l'arco dell'anno

UO 3



PANNELLI DI ANALISI CHIMICO FISICHE E MICROBIOLOGICHE

Finocchiona

- pH
- Aw
- Enterococchi
- lattobacilli mesofili
- lattococchi mesofili
- lieviti
- Stafilococchi coagulasi-positivi
- Stafilococchi coagulasi-negativi
- Leuconostoc
- Listeria spp. e *L. monocytogenes* qualitativa (se presente, eseguire prova quantitativa ed inviare a CREP per sierotipizzazione)
- Salmonella (se presente, inviare a CREP per sierotipizzazione)

Fior di latte

- pH
- Aw
- Pseudomonas spp. UFC/g
- Enterococchi
- lattobacilli mesofili
- lattococchi mesofili e termofili
- lieviti (annotare l'eventuale presenza di muffe)
- Enterobatteriacee
- Stafilococchi coagulasi-positivi
- Listeria spp. E *L. monocytogenes* qualitativa (se presente, eseguire prova quantitativa e inviare a CREP per sierotipizzazione)
- Leuconostoc

Campioni ambientali

Ricerca di *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes*



ANALISI QUALITATIVE DEI PRODOTTI

Determinazione con tecnica **Near Infrared Transmittance** di:

- GRASSO
- UMIDITA'
- PROTEINE
- SOLIDI TOTALI (SOLO NEL FIOR DI LATTE)



Esecuzione di **panel test** per evidenziare correlazioni tra i processi di produzione, la composizione del microbioma, le caratteristiche chimico fisiche e le qualità organolettiche dei prodotti selezionati



UO 2

- Selezione di un pannello di target molecolari da saggiare secondo un approccio di **metabarcoding** su piattaforma NGS di seconda generazione e test di prova per messa a punto dei saggi molecolari
- Preparazione di librerie genomiche per le analisi di sequenziamento in NGS su piattaforma di seconda generazione
- Selezione di un sub campione di biofilm, eventualmente rilevati nelle aziende oggetto di studio, sui quali eseguire un'analisi genomica (**WGS**) in NGS.
- Messa a punto di saggi molecolari dei geni coinvolti nello sviluppo di biofilm mediante metodi molecolari (ica ADBC operon, geni aap, bhp, pel, lasI, rhII, etc...)

UO 1

- Messa a punto di una pipeline di analisi bioinformatica per l'identificazione di specie batteriche e mitotiche



Identificazione di specie microbiche in alimenti e ambiente

Roma, 27 Ottobre 2021



Bianca Maria Varcasia

UOC Microbiologia degli Alimenti
Lab. Biotecnologia Applicate agli Alimenti





PAROLE CHIAVI

- METAGENOMICA
- WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS)
- AMPLICON SEQUENCING
- WORKFLOW PER L' ANALISI METAGENOMICA



METAGENOMICA

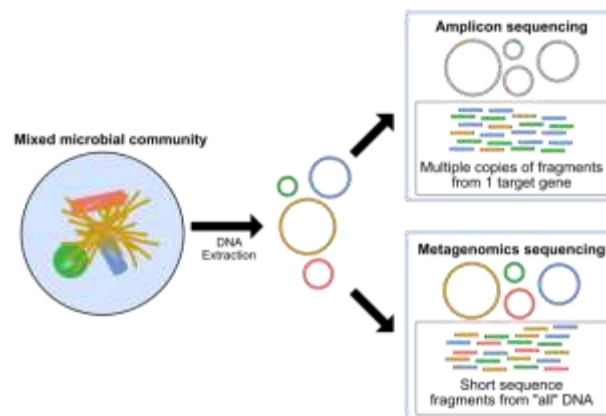
AMPLICON SEQUENCING

WGS

→ Campioni ambientali nei quali è stata
rilevata la presenza di BIOFILM

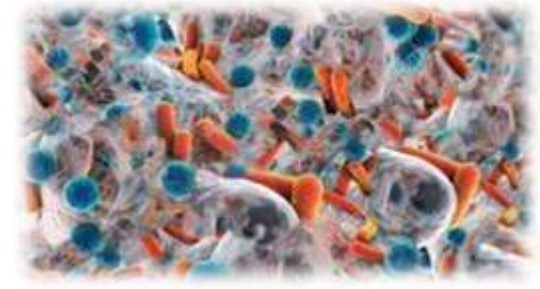
↓
Cepi ipotetici produttori di
BIOFILM

↓
Campioni alimentari e ambientali



(Fonte: <https://astrobiomike.github.io>)

BIOFILM



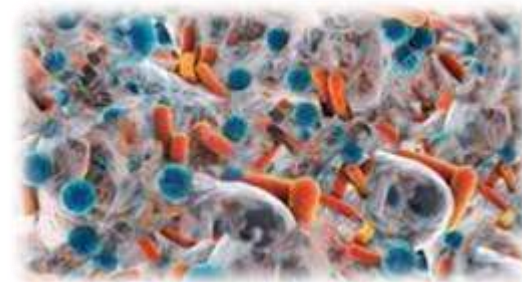
COSA SI INTENDE PER BIOFILM?

Aggregazioni lieviti e batteri e polimeri organici (EPS: eso-poli-saccardi, ovvero conglomerati polimerici costituiti essenzialmente di proteine, polisaccaridi, glicoproteine e acidi nucleici) che formano sottili pellicole aderenti a superfici di supporto (materiale biologico o abiotico)

A COSA SERVE IL BIOFILM?

- Protezione dagli stress ambientali (come le variazioni di temperatura e disidratazione)
- Riserva dei nutrienti (“trappola” per la materia organica e minerale)
- Crea una vera e propria comunicazione tra i batteri attraverso il processo di *quorum-sensing* (scambi che le cellule eseguono dopo l’adesione alla superficie solida)
- Solido punto di ancoraggio per gli ospiti





IMPORTANZA PER L'INDUSTRIA ALIMENTARE

Il biofilm rappresenta una potenziale fonte di contaminazione costante, strettamente legata alle procedure di sanificazione sia per motivi tecnologici che di sicurezza alimentare:

- Contaminazione irregolare e incontrollabile durante la produzione a causa del distacco imprevedibile di cellule dal biofilm;
- Resistenza allo scorrimento dei fluidi, aumento della rugosità delle superfici;
- Riduzione delle performance termiche (es. scambiatori) e di filtrazione (es. filtrazione a membrana) inficiandone le rese;
- Favorisce la corrosione delle superfici (bio-corrosione);
- Resistenza alla disinfezione attraverso la neutralizzazione dei biocidi o la modificazione dello stato fisiologico;
- Costituisce un potenziale “serbatoio” di microrganismi alteranti e patogeni (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (STEC), *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* e *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. butyricum*, *C. difficile*, *C. sporogenes*, *C. perfringens*, *Yersinia enterocolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, lieviti)





COSA SI INTENDE PER AMPLICON SEQUENCING?

Approccio mirato che consente di analizzare la variazione genetica in regioni genomiche specifiche (ad es. 16S, 18S, ITS).

L'utilizzo di questa metodica implica l'uso di primers specifici per un gene target o un frammento di gene.

VANTAGGI NELL'UTILIZZO DEGLI AMPLICON SEQUENCING

- Ricerca in modo efficiente le varianti genetiche utilizzando un approccio altamente mirato;
- Consente il multiplexing* di centinaia o migliaia di ampliconi per poter ottenere un'elevata copertura;
- Consente il risequenziamento altamente mirato anche di aree difficili da sequenziare (es. regioni ricche di GC);
- Applicabile ad una vasta gamma di progetti sperimentali;
- Riduzione dei costi di sequenziamento e dei tempi di risposta rispetto ad approcci più ampi (es. WGS).

* *Multiplexing*: raggruppamento e sequenziamento di tutti i frammenti di DNA di diversi campioni contemporaneamente



Workflow per l'Amplicon Metagenomic Sequencing

**Prelievo del
campione**



Estrazione DNA



**Quantificazione
DNA**



Dall'alimento.....al gDNA!



Workflow per l'Amplicon Metagenomic Sequencing

**Preparazione
librerie**



**Quantificazione,
controllo di qualità
e normalizzazione**



Sequenziatore

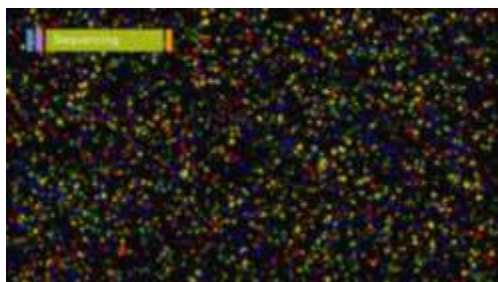


Dal gDNA.....alle librerie!

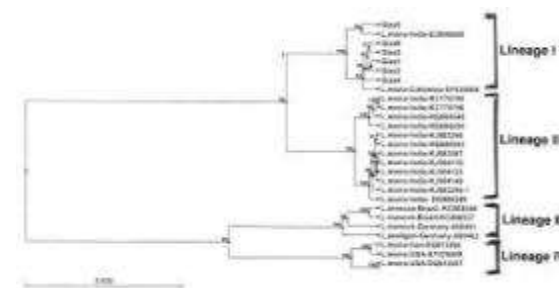


Dalle librerie.....ai risultati!

Analisi dei dati



Risultati



Prelievo campioni

Prelevare 10 g di campione ed omogenerarlo in 90 ml di brodo non selettivo mediante omogeneizzatore



Campione alimentare: prelevato sterilmente in modo da non alterare il microbiota presente

Campione ambientale: tampone effettuato nei punti critici della produzione dove ci potrebbe essere formazione di biofilm (tamponi di cotone con manico di legno e scovolini)

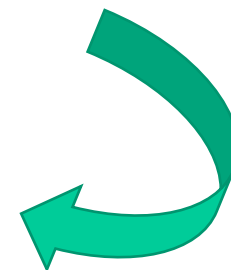


Congelare appena possibile le provette a -20°C fino all'invio presso il laboratorio. E' importante che i campioni siano mantenuti durante il trasporto a temperatura controllata (-20°C).

Estrazione DNA

Estrazione automatizzata con biglie magnetiche

Acidi nucleici di alta qualità privi di proteine, nucleasi e altre impurità



Quantificazione DNA

FLUORIMETRO

Strumento che quantifica il materiale genetico (DNA/RNA) in modo accurato, utilizzando intercalanti fluorescenti in grado di legarsi in modo aspecifico al DNA/RNA, generando una fluorescenza rilevabile

La $[DNA]_f$ da utilizzare nella preparazione delle librerie va da **10 pg a 50 ng**



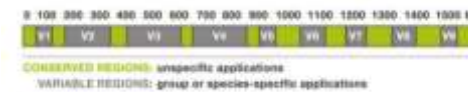
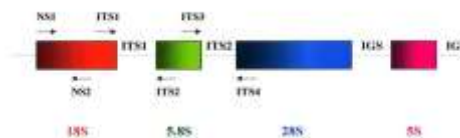
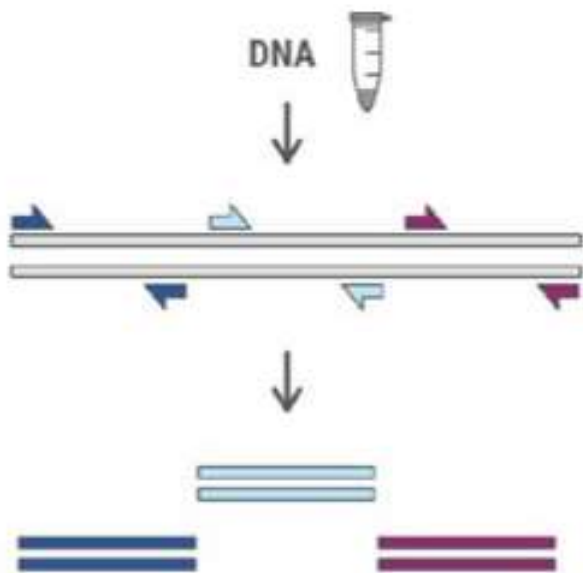
Fonte: <https://www.thermofisher.com>



Preparazione librerie

Multiplex PCR

PCR che usa primers locus specifici per amplificare contemporaneamente le regioni variabili del 16S rRNA batterico (regioni da V1 a V9) e regioni ITS1 e ITS2 (spazi di trascrizione interna) micotiche



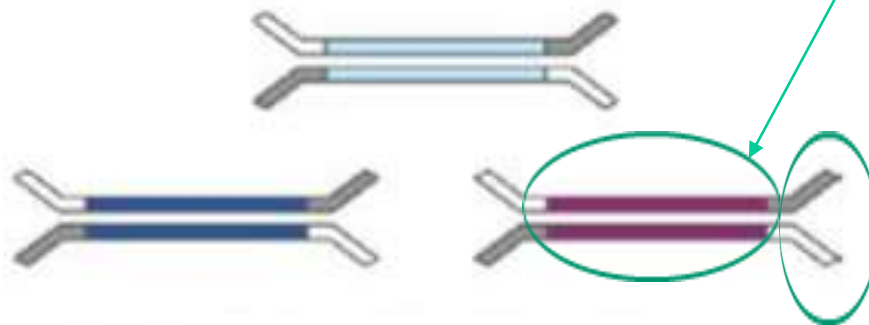
Preparazione librerie

Clean-up

→ Lavaggio con biglie magnetiche ed etanolo all' 80% per la rimozione dell'eccesso di primers, nucleotidi, sali, enzima, prodotti di amplificazione non specifici e inibitori della PCR (es. polisaccaridi, polifenoli, lipidi).

Indexing Step

→ Fase nella quale si aggiungono alle estremità dell'amplicone gli indici (barcode) comprensivi degli adattatori per la flow cell



Preparazione librerie

Clean-up

→ Lavaggio con biglie magnetiche ed etanolo all' 80% per la rimozione dell'eccesso degli index

Library Quantification

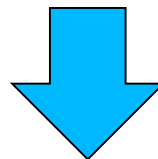
→ Fase nella quale si quantificano le librerie e si valuta l'insert size mediante qPCR , al fine di non includere nella quantificazione altro DNA o artefatti dovuti alle strutture secondarie degli adattatori





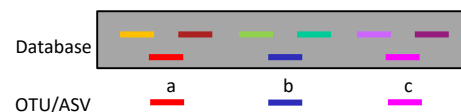
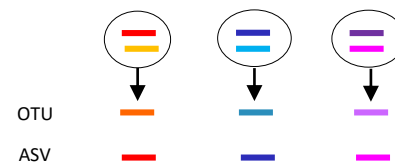
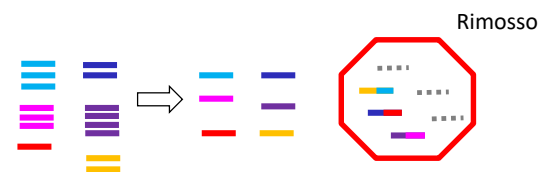
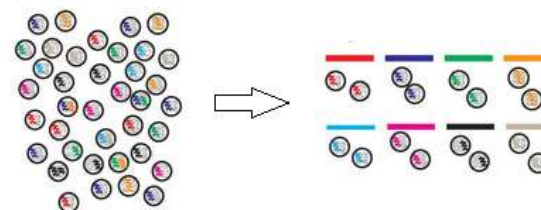
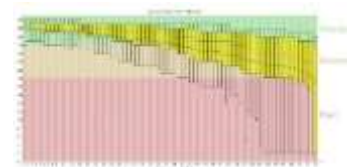
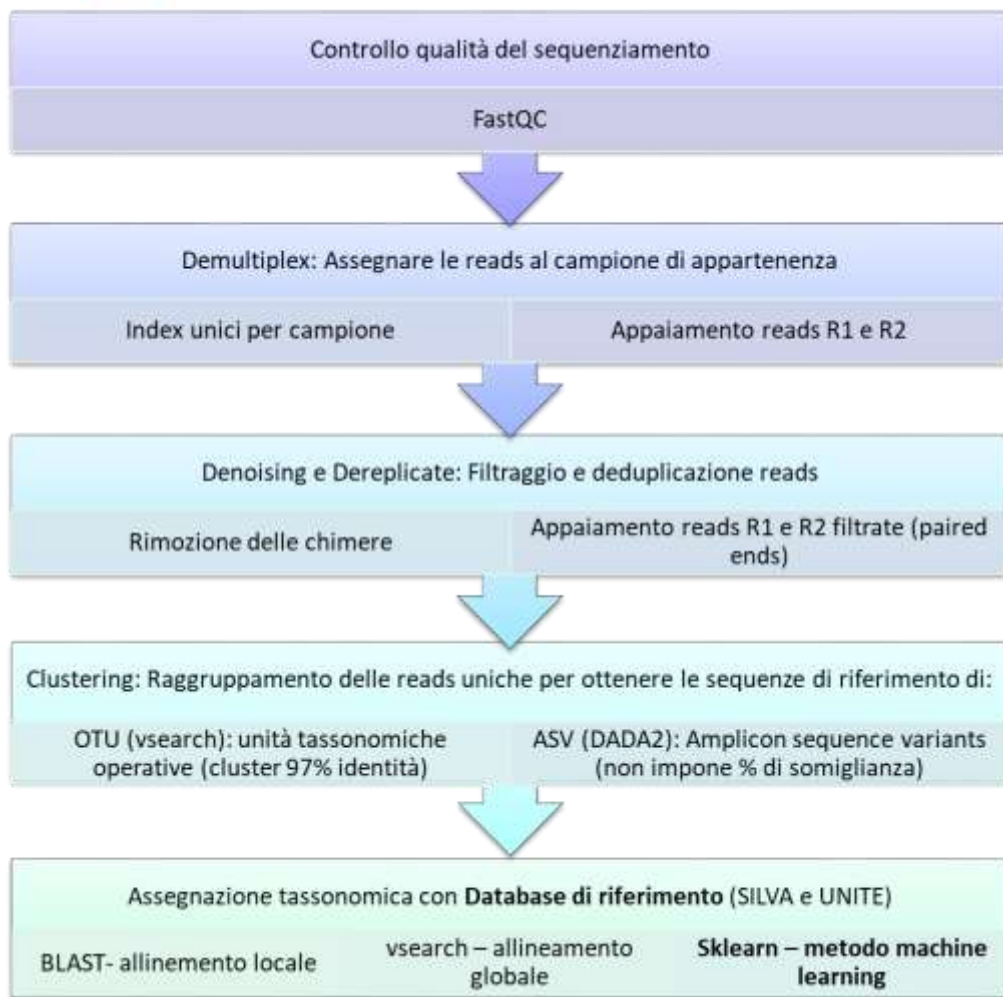
Sequenziatore

1. DENATURAZIONE DEL POOL: rottura del doppio filamento con conseguente formazione dei filamenti singoli. Questa fase permette il legame dei filamenti singoli agli oligo immobilizzati nella flow cell
2. DILUIZIONE DEL POOL
3. CARICAMENTO DELLO STRUMENTO



RAW READS





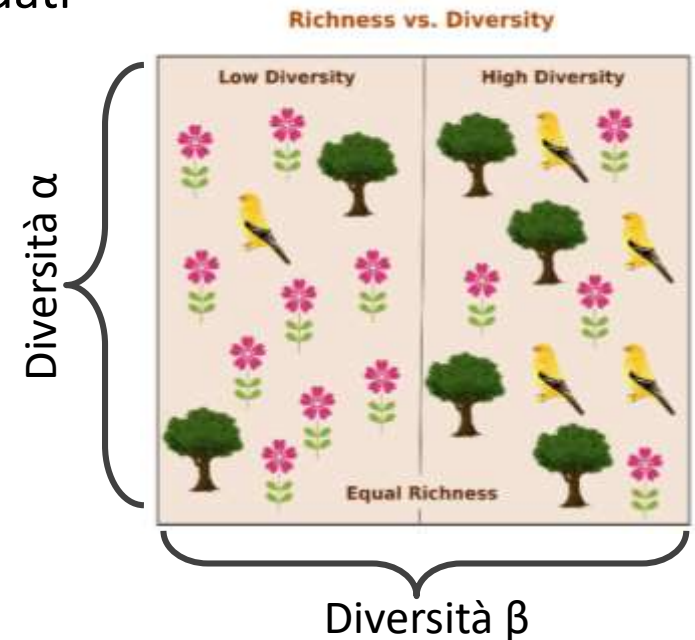
Analisi dati

Diversità Alfa: variabilità interna del campione

- Specie osservate: ricchezza, numero di specie diverse presenti
- Indice di Simpson e di Shannon: indici di diversità, tengono conto anche abbondanza relativa di ogni specie
- Eveness, indice di uniformità: indica la modalità di ripartizione degli individui nelle diverse specie che compongono la comunità
- Curve di rarefazione: valutare livello di saturazione del campione raggiunto

Diversità Beta: quanta sono diversi due campioni tra loro

- Distanza di Jaccard: misura la dissimilarità tra i campioni in termini qualitativi
- Distanza di Bray-Curtis: quantifica la dissimilarità tra le comunità di due campioni in termini quantitativi
- UNIFRAC: metrica basata sulle distanze filogenetiche delle specie di due comunità (qualitativa e quantitativa)
- PCoA: analisi delle coordinate principali, metodo per visualizzare il livello di somiglianza delle comunità, basato su matrice Bray-Curtis o UNIFRAC



Visualizzazione grafica

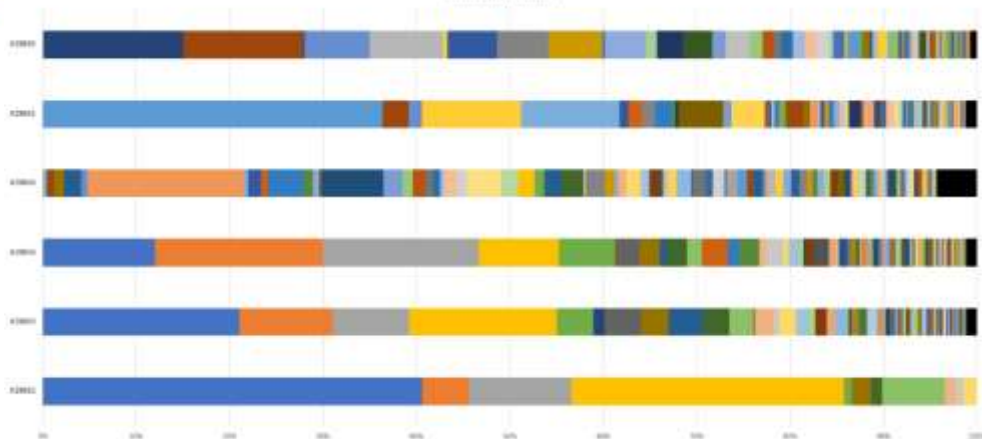
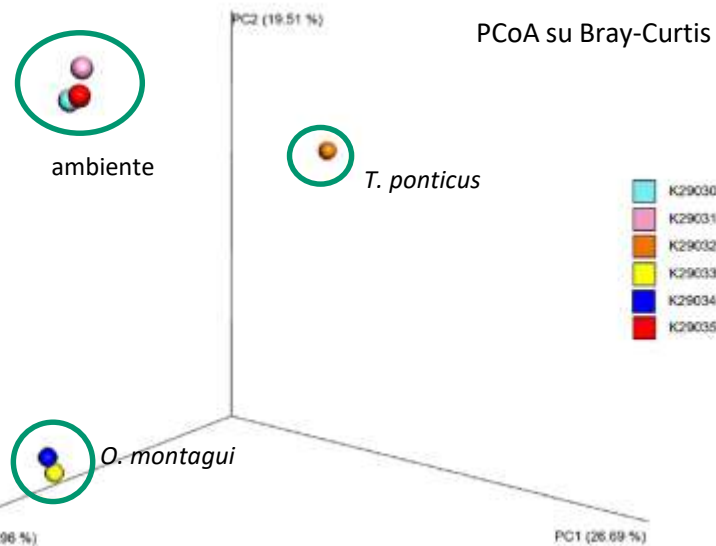
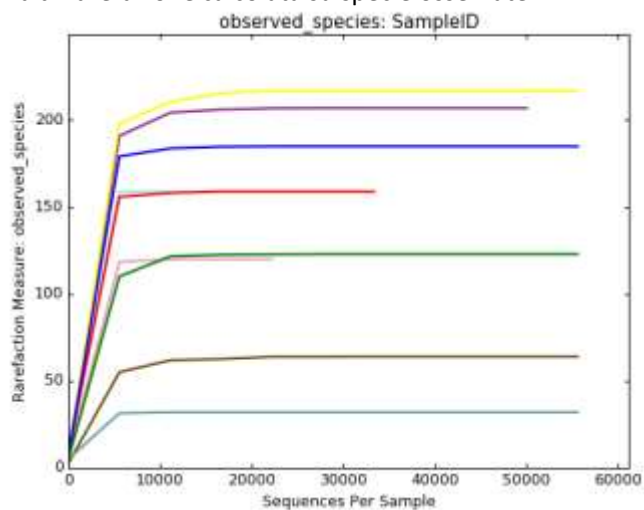


Grafico della composizione a livello di genere della comunità per ogni campione. Stesso colore corrisponde stesso genere.

Curva di rarefazione calcolata su specie osservate



Fonte: Russini et al., (2021) Discovering symbiosis in the supralittoral: bacterial metabarcoding analysis from the hepatopancreas of *Orchestia* and *Tylos* (Crustacea). Symbiosis



