



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

**Evoluzione della comunità microbica durante
la *shelf-life* della Ricotta Industriale**

Relatore: Dott.ssa Barbara Cardazzo

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Correlatore: Dott.ssa Eleonora Sattin

BMR Genomics

Laureanda: Alessia Tiengo

Matricola: 1057300

Anno Accademico 2014/2015

*“Non importa quanto si dà
Ma quanto amore si mette nel dare”*

Madre Teresa di Calcutta

Alla Mia Famiglia e

Ad Andrea

RIASSUNTO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUZIONE	1
1.1 La Ricotta, definizione e produzione	1
1.1.1 Le materie prime per la produzione della Ricotta	2
1.1.2 Composizione tipica della Ricotta	3
1.2 I microrganismi contaminanti della Ricotta.....	4
1.2.1 Caratteristiche microbiologiche delle Ricotte vaccine industriali a lunga conservazione ..	4
1.2.2 Le contaminazioni dei prodotti lattiero-caseari	4
1.2.3 <i>Bacillus</i>	5
1.2.3.1 <i>Bacillus</i> e le relative malattie di origine alimentare.....	6
1.3 Post-contaminazione microbica della Ricotta.....	9
1.4 Analisi microbiologica degli alimenti	9
1.4.1 Analisi molecolare del gene 16S rRNA.....	11
1.4.1.1 <i>Multilocus Sequence Typing</i>	12
1.4.2 Analisi <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS).....	13
1.4.2.1 Piattaforma Illumina.....	14
1.4.2.2 Tecnologie di sequenziamento Illumina.....	14
1.4.3 Studio delle comunità microbiche negli alimenti con tecniche <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS).....	16
2. SCOPO	19
3. MATERIALI E METODI.....	21
3.1 Campioni analizzati	21
3.2 Preparazione campioni.....	21
3.3 Analisi microbiologica.....	22
3.4 Analisi molecolare	25
3.4.1 Analisi delle comunità microbiche della Ricotta tramite sequenziamento Illumina.....	25
3.4.1.1 Estrazione RNA.....	25
3.4.1.2 Retrotrascrizione RNA.....	27
3.4.1.3 <i>Real-Time</i> PCR per controllare la qualità dell'estrazione.....	27
3.4.1.4 Costruzione librerie 16S Illumina.....	29
3.4.2 Identificazione di specie dei ceppi isolati da Ricotta “Rosa”.....	33
3.4.2.1 Estrazione DNA.....	33

3.4.2.2 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	34
3.4.2.2.1 PCR per l'identificazione di specie.....	35
3.4.2.2.2 <i>Multilocus Sequence Typing</i> per l'identificazione di B1 e B3.....	36
3.4.2.2.3 <i>Screening</i> per la ricerca dei geni codificanti le principali tossine in B1 e B3.....	39
3.4.2.3 Elettroforesi in gel d'agarosio.....	41
4. RISULTATI.....	43
4.1 Analisi microbiologica e valutazione del pH dei campioni.....	43
4.2 Comunità microbica durante la <i>shelf-life</i>	44
4.3 Caratterizzazione molecolare di colonie “Rosa” isolate dal campione 14_S3.....	47
4.4 Identificazione di specie dei ceppi isolati da Ricotte "Rosa".....	48
5. DISCUSSIONE.....	51
5.1 Analisi della carica batterica e del pH delle Ricotte.....	51
5.2 Valutazione delle comunità microbiche durante la <i>shelf-life</i>	52
5.3 Identificazione di <i>B.cereus</i> isolato da Ricotte “Rosa”.....	53
6. CONCLUSIONI.....	55
7. BIBLIOGRAFIA.....	57

RIASSUNTO

Gli alimenti costituiscono degli ecosistemi ben definiti, la cui complessità è determinata dalle interazioni tra i fattori ambientali estrinseci, ed intrinseci dell'alimento stesso. Le popolazioni microbiche presenti nell'alimento, possono modificare la loro composizione durante tutta la *shelf-life* del prodotto, instaurando dei meccanismi di interazione che spesso vengono solo parzialmente evidenziati con i metodi di analisi microbiologica tradizionali.

Il *Next Generation Sequencing* (NGS) rappresenta uno strumento potente per studiare a fondo le comunità microbiche contenute negli alimenti, ma anche in diverse nicchie ecologiche. Inoltre, viene sempre più considerato come una tecnica indispensabile per complementare le metodiche coltura-dipendenti della microbiologia, visto che spesso molti microrganismi sono difficilmente isolabili.

In questo studio sono state analizzate 26 Ricotte prodotte dal caseificio "Elda" (VR) utilizzando inizialmente un approccio coltura-dipendente associato all'isolamento e al sequenziamento *Sanger* per l'identificazione di specie e successivamente una metodica coltura-indipendente, l'analisi NGS per ottenere maggiori informazioni riguardo alle comunità microbiche che costituiscono la Ricotta e alla loro evoluzione durante la *shelf-life*.

La valutazione della *shelf-life* è stata ottenuta utilizzando diversi terreni colturali che hanno permesso di rilevare come la carica batterica mesofila, già alta all'inizio del campionamento, raggiunga elevati livelli entro i primi 14 giorni di conservazione; mentre la carica delle spore aerobie raggiunge il livello massimo entro i primi 20 giorni.

Durante il campionamento è stata eseguita l'estrazione dell'RNA e dopo aver ottenuto il cDNA dalla sua retrotrascrizione si è costruita una libreria. Il successivo sequenziamento *Next Gen* con Illumina *MiSeq* ha determinato la microflora vivente presente nelle Ricotte. Tale microflora è risultata composta da più dell'80 % da batteri sporigeni, e i tre generi predominanti sono stati: *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Clostridium*.

Il ritrovamento di un campione di Ricotta che al momento dell'apertura della confezione presentava una colorazione "Rosa" ha portato a isolare due colonie in terreno *Tryptic Soy Agar* più glucosio. Il sequenziamento della porzione del gene 16S rRNA delle due colonie ha dimostrato per entrambe un'identità del 99 % con i ceppi appartenenti al gruppo *Bacillus cereus*. Per l'identificazione della specie e del ceppo è stata applicata la metodica *Multilocus sequence typing* (MLST) portando alla definizione di una nuova combinazione allelica identica per le due colonie. La successiva analisi filogenetica, con le sequenze dei nostri campioni e di altri genomi completi appartenenti al gruppo *Bacillus cereus*, ha permesso di dimostrare che i nostri ceppi appartengono alla specie *B.*

wehienstephanensis. Lo studio si è concluso valutando la presenza dei geni codificanti tossine. I ceppi sono risultati positivi a diverse tossine (Nhe e entFM), ma negativi per la tossina emetica.

Parole chiave: Ricotta, *shelf-life*, batteri sporigeni, colorazione Rosa.

ABSTRACT

Foods are well defined ecosystems, whose complexity is determined by the interactions between extrinsic factors (such as the environment) and intrinsic factor, that means factors related to the food itself. Microbial populations in food, can change the composition throughout the shelf-life of the product, establishing mechanisms of interaction that are often only partially highlighted with methods of classical microbiology.

The Next Generation Sequencing (NGS) approach is a powerful tool to study in depth microbial communities in food, but also in different ecological niches. It has also increasingly considered as an essential technique to complement microbiological culture-dependent methods, since often many microorganisms are difficult to be isolated.

The present study analyses 26 Ricotta cheese produced by the dairy plant "Elda" (VR) using an approach initially culture-dependent associated to isolation and Sanger sequencing for species identification and subsequently a culture-independent method associated to NGS analysis to get more information about the microbial communities in the Ricotta cheese and to highlight their evolution during shelf-life.

The evaluation of the shelf-life was obtained using different media to detect mesophilic bacteria, present in an high count at the beginning of the sampling, reaching high levels within the first 14 days of storage; the charge of aerobic spore reached a peak in the first 20 days.

During the sampling RNA extraction was performed and, after obtaining the cDNA from its reverse transcription, libraries were constructed. The Next Gen sequencing approach using an Illumina MiSeq determined the living microflora in these Ricotta cheeses. This microflora was made up of more than 80 % by sporeforming bacteria, and three genera were predominant: *Bacillus*, *Paenibacillus* and *Clostridium*.

The finding of a sample of Ricotta cheese presenting a "Pink" shade brought to the isolation of two pigmented colonies in Tryptic Soy Agar added with glucose. The sequencing of the portion of the 16S rRNA gene of the two colonies shew for both colonies an identity of 99 % with the strains belonging to the group *Bacillus cereus*. Multilocus sequence typing (MLST) was applied for species- and strain- identification, leading to the definition of the same combination of alleles identical for the two colonies, (ST 1008). The subsequent phylogenetic analysis, including the sequences of other completely sequenced genomes belonging to the group *Bacillus cereus*, demonstrated that our strains belong to the species *B. wehienstphanensis*. The study was completed by verifying the possible presence of toxins. The strains tested were positive to some toxins (such as Nhe and entFM), but negative for the emetic toxin.

Keywords: Ricotta cheese, shelf-life, sporeforming bacteria, pink discoloration.

1. INTRODUZIONE

1.1 La Ricotta, definizione e produzione

Relegata in passato al ruolo di alimento povero, conosciuta e consumata già nell'antichità da Greci e Romani, la Ricotta Vaccina è stata negli ultimi anni fortemente rivalutata sia per le sue caratteristiche nutrizionali sia per la sua interessante valenza come ingrediente nella preparazione di molti piatti.

La Ricotta è una tipica varietà di formaggio Italiano (dal latino "recoctus" cioè "cotto due volte") prodotta dal siero di latte proveniente dalla produzione del formaggio attraverso un trattamento termico (85-90 °C) che porta alla coagulazione delle proteine del siero del latte dopo l'aggiunta di agenti acidificanti, come succo di limone o aceto (Fuselli *et al.*, 2014).

In Italia la Ricotta non è tutelata da una specifica normativa, fatte salve le disposizioni generali di carattere igienico (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

Secondo il codice personalizzato europeo (sistema armonizzato di codici della nomenclatura internazionale), la Ricotta è classificata come "siero di latte" all'interno della classe dei prodotti lattiero-caseari. Secondo una vecchia legge italiana (Decreto Regionale Italiano 15/10/1925 n. 2033. Offic. J Regionale Italiano no. 281 (1925) attualmente in vigore, la Ricotta non è un formaggio, ma un diverso tipo di prodotto caseario (Fuselli *et al.*, 2014).

Sebbene non definita come un formaggio tipico, poiché si tratta di un prodotto secondario della produzione casearia, la Ricotta è un latticino commercialmente diffuso, a causa della sua varietà di utilizzo e il suo alto valore biologico. Infatti, il siero di latte è ricco di proteine e peptidi che svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo del sistema immunitario nella prole dei mammiferi (Zimecki *et al.*, 2007).

Con la parola Ricotta si intende, tuttavia, una pluralità di prodotti ottenuti da materie prime diverse per origine e composizione, secondo tecniche variabili, generalmente freschi, ma anche caratterizzati da stagionatura più o meno prolungata (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

Per quanto riguarda le Ricotte fresche, fabbricate sia a livello di caseificio industriale sia artigianale e commercializzate in Italia, è possibile identificare almeno tre grandi gruppi (Mucchetti *et al.*, 2002b):

- Ricotta prodotta in strutture industriali di medie o grandi dimensioni, confezionata per assicurare una *shelf-life* di 20-40 giorni;

- Ricotta prodotta in strutture industriali di piccole o medie dimensioni, con *shelf-life* media di circa una settimana;
- Ricotta prodotta in strutture aziendali, di alpeggio, agropastorali o di piccola industria a rapido consumo (1-2 giorni).

Questi tre gruppi possono essere a loro volta suddivisi in funzione della specie animale da cui origina il siero, ovvero bovino, ovino, bufalino e in misura minore caprino.

La tecnologia di base della produzione di Ricotta è comune, con alcune importanti differenze nel processo produttivo dovute alla diversa previsione di *shelf-life* da conferire al prodotto. La conservabilità della Ricotta “fresca” infatti è legata alle condizioni utilizzate per il drenaggio della scotta, che può avvenire in sistemi “protetti” oppure per sgrondo dalle fiscelle o dalle tele. La modalità del confezionamento (a caldo o a freddo, in ambienti protetti o in caseificio) determinano la frequenza con cui il rischio di post-contaminazione può concretarsi. A tale scopo, sempre più spesso, la Ricotta “fresca” viene sottoposta a un secondo trattamento termico alla fine del periodo di sgrondo della scotta, seguito dal confezionamento a caldo (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

I punti cardine del processo di produzione delle numerosissime varietà di Ricotta disponibili sul mercato, da cui discendono come ramificazioni tutte le varianti di prodotto (Mucchetti *et al.*, 2002), possono essere sintetizzati in:

- Scelta e preparazione della materia prima;
- Denaturazione termica e aggregazione delle proteine denaturate;
- Separazione della Ricotta dalla scotta;
- Raffreddamento e confezionamento.

1.1.1 Le materie prime per la produzione della Ricotta

La materia prima alla base della Ricotta è senza dubbio il siero (bovino, ovino, o bufalino) ma può essere anche una miscela di siero e latte e/o panna.

Oltre al latte e/o alla crema, nella preparazione della “materia prima” per la produzione della Ricotta possono entrare altri ingredienti, il più diffuso dei quali è il sale (0,1-1 % indicativamente). Altre pratiche consistono nell’aggiunta di siero in polvere, caseine, caseinati o proteine del latte ricavate per ultrafiltrazione (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

- **Il Siero**

Il siero è un prodotto secondario che si ottiene dal processo di caseificazione e in generale dalle lavorazioni dell’industria casearia. Si tratta della frazione liquida risultante dalla coagulazione del latte e dalla successiva separazione della cagliata. La separazione del siero dal coagulo è governata da un meccanismo complesso nel quale intervengono fattori “interni”, dati dalle caratteristiche di

contrattilità e permeabilità della cagliata, e fattori “esterni”, rappresentati da azioni meccaniche (principalmente rottura), termiche (cottura) e fisico-chimiche (acidificazione-salatura) (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

Il riscaldamento del siero e la separazione dei solidi in esso contenuti portano poi alla produzione della Ricotta.

L'esatta composizione del siero di latte dipende dal processo di caseificazione: le principali proteine del siero sono β -lattoglobulina (49 %), α -lattoalbumina (19 %), immunoglobuline (11 %) e l'albumina sierica (5 %). Le proteine minori sono lattoferrina, lattoperossidasi e lisozima, che hanno importanti funzioni antimicrobiche; in particolare la lattoferrina si lega al ferro e ne aumenta il trasporto e l'assorbimento (Fuselli *et al.*, 2014).

- **La panna o crema di latte**

La panna è il latte arricchito in grasso, perché anche se in proporzioni diversa, è costituita da tutti i componenti del latte. Il titolo di grasso della panna varia dall' 8-10 % al 60 % ed è in relazione al sistema di scrematura. La panna si ottiene per affioramento o per centrifugazione (Vitagliano. 2005).

- La scrematura per affioramento si ottiene lasciando a riposo il latte in recipienti bassi e larghi alla temperatura di 7-8 °C. La panna così ottenuta è detta panna acida poiché i batteri lattici svolgono la loro azione durante la fase di affioramento. Questo sistema è ormai in uso solo per la produzione di burro casareccio e permette di ottenere creme con un titolo in grasso del 20-25 %.
- La scrematura per centrifugazione invece ricorre all'utilizzo di centrifughe che ruotando velocemente (6000/7000 giri/minuto) riescono a separare la parte grassa dal latticello arrivando ad ottenere una crema con il 30-40 % di grasso. Questa panna non subisce acidificazione perciò è detta panna dolce.

1.1.2 Composizione tipica della Ricotta

La Ricotta ha un' umidità pari al 24 ± 3.3 %, tenore medio di grasso e proteine quasi equivalente di circa il 9 %. La presenza di lattosio è pari al 3.35 %, mentre il contenuto di galattosio è trascurabile. I valori di galattosio, acido acetico e acido lattico devono essere circa zero: valori superiori, infatti, dimostrerebbero un'eventuale processo fermentativo in atto. La differenza tra il valore di azoto solubile a pH 4.6 e, quello di azoto non proteico, indica la presenza di una quota residua di sieroproteine non denaturate. Infatti il recupero delle sieroproteine non supera l'80 %.

Infine il valore del potenziale di ossidoriduzione sempre positivo indica la presenza di un ambiente non favorevole alla crescita di microflora sporigena anaerobia (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

A causa dell'elevata umidità e di valori di pH iniziali superiori a 6.0, la Ricotta è suscettibile alle alterazioni microbiche e, anche in condizioni di conservazione refrigerata, ha una limitata *shelf-life* (Hough *et al.*, 1999).

1.2 I microrganismi contaminanti della Ricotta

La Ricotta è un latticino la cui tecnica di produzione non prevede l'uso di starter e la cui microflora è quindi la somma di quella resistente al trattamento termico impiegato per denaturare le proteine e di quella eventuale di post-contaminazione. Le caratteristiche microbiologiche delle Ricotte variano perciò in funzione delle tecnologie produttive e, per questo motivo, in generale le Ricotte industriali a "lunga conservazione", ottenute con doppio trattamento termico, differiscono dalle Ricotte a "breve conservazione", siano esse industriali o artigianali (Mucchetti *and* Neviani. 2006).

1.2.1 Caratteristiche microbiologiche delle Ricotte vaccine industriali a lunga conservazione

La microflora residua al processo di produzione, o comunque rilevata nel prodotto per post-contaminazione, è in grado di riprodursi e di causare l'acidificazione della Ricotta. La carica microbica infatti aumenta per la presenza di batteri lattici (cocchi e lattobacilli) sopravvissuti al trattamento termico di "ricottazione". Solo le Ricotte che vengono sottoposte ad un ulteriore trattamento termico prima del confezionamento non subiscono variazioni di carica microbica.

1.2.2 Le contaminazioni dei prodotti lattiero-caseari

Tra i microrganismi alteranti includiamo: batteri Gram-negativi psicrotrofi aerobici, lieviti, muffe lattobacilli eterofermenti e batteri sporigeni. I batteri psicrotrofi possono produrre una grande quantità di enzimi idrolitici extracellulari e la ricontaminazione con questi batteri è un fattore determinante nella *shelf-life* del prodotto. Il deterioramento ad opera dei funghi si manifesta con un'ampia varietà di prodotti metabolici che provocano perdita di odori e sapori, oltre a cambiamenti visibili in colore e struttura. Coliformi, lieviti, batteri acido lattico eterofermenti e batteri sporigeni sono tutti responsabili di difetti, come l'occhiatura a seguito della formazione di gas, nei formaggi. Una causa indiretta del deterioramento del prodotto lattiero-caseario sono gli enzimi microbici, come proteasi, fosfolipasi e lipasi, alcuni dei quali possono rimanere attivi nel prodotto alimentare anche a seguito della morte del microbo (Loralyn *et al.*, 2009).

Mentre una post-contaminazione può essere controllata osservando semplici accorgimenti, le contaminazioni dei microrganismi che superano la pastorizzazione presentano un problema più serio. Due generi di batteri sporigeni, *Bacillus* e *Paenibacillus*, sono stati identificati come predominanti nel latte pastorizzato. *Bacillus spp.* e *Paenibacillus spp.* inoltre, sono stati isolati dagli ambienti di lavorazione dei caseifici e impianti di trasformazione, suggerendo che questi organismi alterativi possono entrare nelle varie fasi della catena di produzione del caseificio. Mentre i

principali sporigeni isolati all'inizio della *shelf-life* del latte pastorizzato sono tipicamente *Bacillus spp.*, successivamente nel corso della *shelf-life* sono stati identificati per lo più *Paenibacillus spp.*, suggerendo che *Paenibacillus spp.* può avere una migliore abilità di crescere nel latte conservato a temperature di refrigerazione (Switt *et al.*, 2014).

La crescita dei batteri sporigeni nei prodotti lattiero caseari può influenzare negativamente sia la qualità del prodotto che la sicurezza del prodotto. Alcuni batteri, tra quelli formanti le spore, possono infatti rappresentare un rischio di intossicazione alimentare causato dalla produzione di tossine. È per questo che nel settore lattiero-caseario, la formazione delle spore, è considerata un'importante contaminazione. Generalmente, la pastorizzazione non ha effetto sulle endospore, le quali resistono alle alte temperature, limitando quindi la possibilità di produrre prodotti minimamente trattati o di estendere la *shelf-life* dei prodotti pastorizzati (Lücking *et al.*, 2013).

1.2.3 *Bacillus*

Bacillus cereus è un batterio Gram positivo, aerobico e/o anaerobico, a forma di bastoncello, mobile grazie alla presenza di flagelli peritrichi. Le cellule tendono a crescere in catene, ma possono crescere anche singolarmente. Le spore sono ovali o cilindriche, localizzate in posizione paracentrale o subterminale. Una caratteristica tipica del gruppo *B. cereus* è la presenza di granuli di poli- β -idrossibutirato nel citoplasma facilmente visibili al microscopio con contrasto di fase (Christiansson *et al.*, 2011). Questi batteri hanno una temperatura ottimale di crescita tra i 25 e 35 °C, ma possono crescere anche in un ampio *range* di temperatura tra 8-55 °C, non sono però adatti a tollerare valori bassi di pH (minimo 5-6) o basso contenuto d'acqua (minima attività dell'acqua di 0.95) (Senesi *et al.*, 2010).



Foto 1: *Bacillus cereus* mostra alcune inclusioni di poli- β -idrossibutirato, sono più piccole e meno luminose delle spore (Logan *et al.*, 2011).

Il gruppo *Bacillus cereus* è composto da *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*. Diversi studi suggeriscono che *B. cereus*

sensu stricto, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* devono essere considerati come membri di un'unica specie definiti *B. cereus sensu lato* (Daffonchio *et al.*, 2000; Helgason *et al.*, 2000a).

Questi batteri condividono un significativo grado di somiglianza genetica, infatti sia l'ibridazione DNA - DNA, che l'analisi di sequenza 16S e 23S rRNA, non riescono a separare nettamente i taxa che sono pertanto considerati come varianti di una sola specie (Senesi *et al.*, 2010).

Bacillus cereus è un batterio ubiquitario del suolo, alcuni ceppi sono usati come probiotici (Duc *et al.*, 2004), mentre altri sono patogeni umani opportunisti che possono causare una sindrome emetica e una diarroica. *Bacillus mycoides* è caratterizzato dalla formazione di rizoidi o colonie micoidi e l'assenza di motilità (Logan & De Vos. 2009). *Bacillus weihenstephanensis* è psicotollerante; può crescere a 7 °C, ma non a 43 °C. Si tratta di un contaminante di prodotti latticini e di alimenti refrigerati (Meer *et al.*, 1991; Larsen & Jørgensen. 1997).

Con l'introduzione dell'obbligo del raffreddamento e del stoccaggio del latte grezzo in celle di raffreddamento, la qualità batteriologica del latte è stata significativamente migliorata (Dubravka *et al.*, 2012).

La specie *Bacillus* e i generi correlati sono stati a lungo considerati importuni dai produttori di alimenti per le loro resistenti endospore (Logan. 2011).

Fino al 1960, la presenza di *B. cereus* è stata associata a carenze igienico sanitarie delle attrezzature di lavorazione, delle fattorie, dei caseifici e della mancanza delle adeguate condizioni di refrigerazione (Christiansson. 2011).

1.2.3.1 *Bacillus* e le relative malattie di origine alimentare

Due diverse malattie di origine alimentare sono attribuite a *B. cereus*: la sindrome diarroica e la sindrome emetica. Entrambe le malattie hanno manifestazioni blande e, in molti casi, sono limitate, anche se sono stati riscontrati casi più gravi con conseguente morte del paziente (Mahler *et al.*, 1997).

- **La sindrome diarroica**

La sindrome diarroica è causata dall'ingestione di cellule vegetative di *B. cereus* presenti negli alimenti, e una volta che il microorganismo raggiungere l'intestino tenue inizia la colonizzazione e quindi la produzione di tossine. La produzione delle tossine diarroiche si verifica, durante la fase di crescita esponenziale ed il meccanismo d'azione di tali tossine non è completamente noto, ma si ritiene che la diarrea sia causata dalla formazione di pori nella membrana cellulare: questo provoca la perdita di ioni Na⁺ e Cl⁻ e di acqua, con conseguente squilibrio elettrolitico (Bhunja. 2008). I sintomi sono: dolore addominale, crampi e diarrea acquosa che iniziano dopo 8-16 ore dall'ingestione di alimenti contaminati, con una durata di 12-24 ore. Gli alimenti maggiormente associati alla sindrome diarroica sono latte e derivati, ortaggi e manzo (Kotiranta *et al.*, 2000). Le

tossine che sono responsabili della sindrome diarroica sono: l'emolisina BL (HBL), l'enterotossina non emolitica (NHE). Inoltre altre enterotossine possono essere considerate potenziali tossine diarroiche come enterotossina FM (EntFM), enterotossina T (BCET), anche se non ci sono dati che dimostrano possibili cause di intossicazione.

L'emolisina BL (HBL) è composto da tre proteine distinte chiamate B, L₁ e L₂; vengono secrete in modo indipendente e tutte e tre sono necessarie per avere la massima attività biologica. Queste tre proteine codificano, rispettivamente, per i geni *hblA*, *hblD* e *hblC*; sono organizzati in un operone nel seguente ordine: *hblC*, *hblD* e *hblA*. Come suggerito dal modello descritto da Senesi *et al.*, 2010, sembra che L₁ e L₂ siano coinvolte nel cambiamento conformazionale del complesso o nella stabilizzazione della direzione della proteina nella membrana (Madegowda *et al.*, 2008). HBL è secreta da circa il 45-65% dei ceppi di *B. cereus* (Ghelardi *et al.*, 2007).

L'enterotossina non emolitica ha tre componenti Nhe ed è stata isolata da un ceppo di *B. cereus* coinvolto in una grande epidemia di intossicazione alimentare in Norvegia (Lund *et al.*, 1996). Le tre proteine Nhe sono codificate dall'operone *nhe* composto dai geni *nheA*, *nheB* ed *nheC* (Lindbäck *et al.*, 2004).

La presenza dei rispettivi tre geni di *nhe* e *hbl*, non è necessaria per l'attività delle tossine, ma la loro compresenza comporta la massima virulenza (Forghani *et al.*, 2014).

Mentre per la secrezione di HBL è fondamentale la presenza di un apparato flagellare di esportazione per rilasciare la proteina all'esterno della cellula (Ghelardi *et al.*, 2007), per la secrezione di Nhe non viene richiesto tale meccanismo (Senesi *et al.*, 2010).

Il gene *entFM* responsabile della produzione dell'enterotossina FM si trova sul cromosoma e sembra essere comune nei ceppi *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Nella maggior parte degli studi condotti è stato dimostrato che entFM è associato a ceppi epidemici (Ngamwongsait *et al.*, 2008). Per indurre l'infezione, *B. cereus* deve colonizzare e persistere nell'intestino dell'ospite. Tran *et al.*, 2010 hanno dimostrato che EntFM di *B. cereus* è legata alla peptidasi di parete cellulare (Cwps), ed è stato proposto dunque di rinominare questa proteina in CwpFM. CwpFM è coinvolta nella forma e motilità batterica, nell'adesione alle cellule epiteliali in *B. cereus*, e nella formazione di biofilm. Inoltre, CwpFM induce la vacuolizzazione dei macrofagi. Tutti questi caratteri fenotipici potrebbero spiegare il ruolo di CwpFM durante la virulenza.

Il gene *bceT* è stato identificato in un clone da una libreria genomica di *B. cereus* ceppo B-4ac. La sequenza amminoacidica dell'enterotossina bceT è stata sequenziata per un certo numero di ceppi appartenenti al gruppo *B. cereus* (Hansen *et al.*, 2003).

- **La sindrome emetica**

La sindrome emetica si verificò per la prima volta nel Regno Unito nel 1970, è caratterizzata da nausea e vomito entro le 5-6 ore dal consumo del cibo contaminato e può durare fino a 24 ore. Principalmente i cibi contaminati sono: piatti di riso prevalentemente orientali, anche se di tanto in tanto altri alimenti come la panna pastorizzata, budino di latte, piatti di pasta e alimenti ricostituiti per lattanti. I casi sono solitamente sporadici, tuttavia, sono stati riportati casi di morte sia in bambini che in giovani adulti (Logan. 2011). La sindrome emetica indotta da *B. cereus* è dovuta all'intossicazione con cereulide, un piccolo peptide ciclico di 1.2 KDa ed è un ionoforo potassio-dipendente (Forghani *et al.*, 2014). La tossina è sintetizzata enzimaticamente da un peptide non-ribosomiale (NRPS) localizzato in un grande plasmide contenente un cluster di geni di 23Kb (*ces*) coinvolti nella produzione del cereulide. Il cereulide agisce come ionoforo, formando un poro e portando ad insufficienza epatica (Castiaux *et al.*, 2014).

La presenza di ceppi emetici di *Bacillus* spp. nei prodotti alimentari, nei prodotti lattiero-caseari particolarmente ricchi di nutrienti, esposti ad una temperatura di sintesi favorevole alla cereulide possono costituire un potenziale pericolo per la salute dei consumatori. È necessaria la presenza di circa 10^5 - 10^8 cellule per grammo nell'alimento per produrre sufficiente tossina; produzione di tossina che è influenzata dalla natura dell'alimento (Logan. 2011). Studi fenotipici e genotipici hanno dimostrato che i ceppi che producono il cereulide appartengono ad un omogeneo *cluster* di batteri mesofili, mentre i bacilli responsabili della sindrome diarroica sono eterogenei e ne fanno parte sia mesofili che psicotolleranti. A seguito di analisi più dettagliate è stato dimostrato che alcuni isolati del psicotrofo *B. cereus* e del psicotollerante *B. weihenstephanensis* possono produrre cereulide. Hoton *et al.*, (2009) hanno studiato la diversità genotipica di questi ceppi che producono cereulide concludendo che esistono due cluster distinti (I e II) dove nel cluster II è presente *B. weihenstephanensis* in grado di crescere a basse temperature (< 7 °C). In un recente studio confrontando le sequenze genomiche tra i *B. cereus sensu stricto* e *B. weihenstephanensis* o all'interno dei *B. weihenstephanensis* si è dimostrato che il cluster di geni *ces* (geni coinvolti nella biosintesi del cereulide) aveva subito un trasferimento genico orizzontale (HGT). Questo potrebbe essere un indizio dal fatto che il cluster *ces* è presente in diversi ospiti (*B. cereus sensu stricto* e *B. weihenstephanensis*), nei quali presenta una diversa localizzazione genomica (plasmidica o cromosomica). Inoltre, un'altra indicazione a favore del trasferimento genico orizzontale è la presenza di putativi elementi genetici mobili fiancheggiati la sequenza *ces* in tutti ceppi emetici testati (Mei *et al.*, 2014). Anche in altri studi è stato riportato che alcuni isolati genici di *B. thuringiensis* hanno proprietà caratteristiche di *B. weihenstephanensis* (Bartoszewicz *et al.*, 2009). Sembrerebbe quindi, che questi elementi genetici mobili giochino un ruolo chiave nel trasferimento del cluster genico del cereulide (Mei *et al.*, 2014).

1.3 Post-contaminazione microbica della Ricotta

Le problematiche relative alla sicurezza alimentare rappresentano un punto cruciale nella tutela della salute pubblica. La qualità e la sicurezza degli alimenti dipendono dagli sforzi di tutte le persone coinvolte nella complessa catena della produzione alimentare, della lavorazione, della conservazione e del consumo. Pertanto, sono necessarie, da un lato, procedure operative per garantire la salubrità degli alimenti e dall'altro sistemi di monitoraggio per garantire che le operazioni vengano effettuate correttamente. I regolamenti europei in materia di sicurezza degli alimenti costituiscono il cosiddetto "Pacchetto Igiene". Il momento del drenaggio della scotta costituisce il punto classico di possibile post-contaminazione microbica della Ricotta, con conseguente riduzione della *shelf-life* a causa di eventuali alterazioni (acidificazioni, produzione di ammoniaca, formazione di odori o gusti sgradevoli, produzione di gas e bombatura delle confezioni). Le vie utilizzate per contrastare tale rischio sono molteplici: riduzione della durata del periodo di sgrondo della scotta, immissione anticipata della Ricotta in cella frigorifera, miglioramento delle condizioni igieniche degli ambienti di lavorazione e di spurgo, impiego di fiscelle monouso. Queste soluzioni, da sole, non sono comunque decisive per consentire alla Ricotta una *shelf-life* superiore a 20-30 giorni o oltre. Per arrivare a questo obiettivo è stata introdotta la pratica del confezionamento a caldo della Ricotta, che viene solitamente applicato al prodotto con spurgo rapido, oppure per il prodotto sottoposto preventivamente a un secondo trattamento termico in scambiatore di calore a temperature comprese tra 85-95 °C e un eventuale trattamento di parziale omogeneizzazione a pressione inferiore a 100 bar (Mucchetti *et al.*, 2006).

1.4 Analisi microbiologica degli alimenti

Le analisi microbiologiche rappresentano un importante strumento per valutare il livello di sicurezza e di igiene degli alimenti. Si tratta di analisi che mirano a stabilire il numero e/o la presenza di specifiche popolazioni microbiche (in particolare di batteri detti "indicatori") e/o di uno specifico microrganismo in un alimento. I batteri che compongono l'alimento possono essere: microrganismi pro-tecnologici e probiotici, patogeni, anti-tecnologici o alterativi. Le informazioni che si possono ottenere sono relative all'origine, alla biologia, all'ecologia, alle attività metaboliche e alla sistematica di questi batteri valutando il loro ruolo e il loro comportamento nei diversi ecosistemi alimentari. Una fase fondamentale delle analisi microbiologiche è la preparazione del campione, il quale deve essere rappresentativo di tutto il prodotto da analizzare e bisogna porre attenzione alle possibili contaminazioni da parte della microflora esogena (Mucchetti, 2006). Le analisi microbiologiche degli alimenti sono realmente efficaci quando utilizzate come supporto all'implementazione di sistemi di garanzia della qualità (es. HACCP) e alla verifica della sua

efficacia. A tale proposito il Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari definisce al punto due che “i prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana”. È per questo che gli operatori del settore alimentare sono tenuti a rispettare i criteri microbiologici attraverso una serie di provvedimenti tra cui il prelievo di campioni e verificare che i valori fissati vengano rispettati (G.U.C.E. n. 2073/2005). Oltre alle metodiche classiche, riconosciute ufficialmente come metodi di analisi, pur presentando dei limiti di utilizzo, oggi sono disponibili nuovi metodi di identificazione e quantificazione che sono stati sviluppati per rispondere all'esigenza di avere tecniche più sensibili, più veloci, automatizzate ed economiche (Mucchetti. 2006).

- **Metodi coltura-dipendenti**

Per metodi coltura-dipendenti si intendono metodi colturali tradizionali in combinazione con analisi fenotipiche (fisiologiche e biochimiche) e genotipiche (PCR specie-specifica o RAPD) necessarie per la corretta identificazione e tipizzazione. Tradizionalmente, la presenza e la concentrazione dei microrganismi in un determinato ambiente o in un processo industriale vengono analizzate con metodi coltura-dipendenti. Tuttavia, è ben noto che questi metodi spesso non riescono a caratterizzare popolazioni o microrganismi per i quali è necessario un arricchimento selettivo. Inoltre, cellule stressate o indebolite hanno spesso bisogno di specifiche condizioni di coltura per il recupero e per diventare coltivabili. Infine il principale inconveniente dei metodi convenzionali risiede nell'incapacità di rilevare le cellule non coltivabili (Justé *et al.*, 2008). Anche in semplici matrici alimentari, come gli alimenti fermentati in cui i microrganismi coltivabili in genere predominano, Ampe *et al.* (1999) hanno dimostrato che almeno il 25-50 % della comunità microbica attiva non può essere coltivata in vitro. Inoltre la maggior parte dei terreni di coltura sono fonti estremamente ricche di carbonio rispetto ai substrati che si ritrovano normalmente in situ, e questo potrebbe influenzare la composizione della comunità microbica coltivata a favore dei copiotrofi (microrganismi che crescono in presenza di elevati livelli di fattori nutritivi) (Nocker *et al.*, 2007).

- **Metodi coltura-indipendenti**

Negli ultimi anni la microbiologia ambientale e la microbiologia alimentare hanno beneficiato dei progressi della biologia molecolare e hanno adottato nuove strategie per rilevare, identificare e monitorare i microbi negli alimenti (Ercolini. 2013). Le tecniche molecolari coltura-indipendenti sono ora disponibili per lo studio degli ecosistemi microbici, permettendo di aprire interessanti prospettive ai problemi relativi alla composizione e della dinamica demografica delle comunità

microbiche in varie nicchie ambientali (suolo, acqua) e negli alimenti (Giraffa *et al.*, 2001). Le tecniche coltura-indipendenti sopperiscono da una parte alla mancanza di conoscenze sull'habitat naturale dei microrganismi e dall'altra alla difficoltà di sviluppare strumenti per la coltivazione che riproducano esattamente le condizioni reali in cui i batteri crescono. I metodi molecolari sono inoltre caratterizzati da rapidità e affidabilità (Ercolini, 2004) e permettono di caratterizzare i microrganismi direttamente all'interno del campione attraverso l'analisi del loro DNA ed RNA. Studiando il DNA si può definire quante e quali specie microbiche sono presenti in un determinato campione, mentre analizzando l'RNA si è in grado di comprendere quali sono le specie metabolicamente attive (Coppola *et al.*, 2003). Queste metodiche si basano sia sul clonaggio e sequenziamento diretto dei frammenti di DNA o spesso sull'amplificazione di sequenze target (geni *marker* come il 16S o ITS) utilizzando la PCR. Svariate metodiche coltura-indipendenti sono state applicate agli studi di ecologia microbica, per esempio *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) o *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Spiegelman *et al.*, 2005). In questi ultimi anni le metodiche di sequenziamento di ampliconi 16S mediante *Next Generation Sequencing* sono state ampiamente applicate per lo studio delle comunità microbiche.

1.4.1 Analisi molecolare del gene 16S rRNA

L'approccio più comunemente utilizzato nello studio della diversità microbica è l'analisi dei geni rRNA. Questi geni sono ubiquitari nei procarioti e costitutivamente espressi presenti in un numero variabile di copie nelle cellule, essenziali per le funzioni cellulari e contengono siti altamente conservati alternati a sequenze variabili. I siti conservati possono essere utilizzati per la costruzione di *primer* universali per l'amplificazione; le sequenze variabili, invece, permettono di quantificare la distanza filogenetica tra batteri, misurare la diversità microbica in un determinato ambiente ed eseguire una classificazione tassonomica dei microrganismi. Nei ribosomi procariotici si trovano tre tipi di rRNA: 16S, 23S e 5S. Inizialmente lo studio della diversità microbica si basava sull'analisi molecole di rRNA 5S, tuttavia, queste brevi sequenze di 120 nucleotidi contenevano pochi siti informativi utili per la classificazione tassonomica (Armougom *and* Raoult, 2009). Al contrario, il gene dell'rRNA 16S, è lungo 1542 nt e consiste in sequenze altamente conservate alternate a 9 sequenze variabili (V1-V9) che includono regioni ipervariabili (figura 1). La lunghezza delle regioni ipervariabili varia approssimativamente da 50 a 100 bp, quella dei tratti conservati da 1 ad un massimo di 11 bp (Petrosino *et al.*, 2009).



Figura 1: Regioni conservate e ipervariabili del gene 16S rRNA (Petrosino *et al.*, 2009).

1.4.1.1 *Multilocus Sequence Typing*

Multilocus sequence Typing (MLST) è stato proposto nel 1998 come metodo approfondito, universale e definitivo per la caratterizzazione dei batteri, utilizzando come esempio *Neisseria meningitidis*, un patogeno umano (Maiden, 2006). MLST è un metodo di tipizzazione, utilizzato fino ad oggi principalmente, ma non esclusivamente, per batteri patogeni, e mira alla caratterizzazione molecolare accurata degli isolati batterici a livello di sottospecie o ceppo. Inizialmente gli studi delle popolazioni batteriche si eseguivano con MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), una tecnica utilizzata nella genetica delle popolazioni di organismi superiori. Il grande svantaggio di MLEE è che il genotipo è dedotto dai dati elettroforetici che sono relativamente di bassa risoluzione; solo le modifiche genetiche che alterano le proprietà elettroforetiche delle proteine, circa un ventesimo di tutte le possibili mutazioni, vengono rilevate. Il MLST ha inoltre altri obiettivi come quello di caratterizzare isolati batterici, dai quali si generano dati che possono essere utilizzati anche per studi evolutivi e della popolazione di una vasta gamma di batteri, indipendentemente dalla loro diversità, dalla struttura della popolazione, o evoluzione. La proposta di MLST come un approccio universale è stata possibile sulla base di tre sviluppi in microbiologia molecolare: una migliore conoscenza dell'evoluzione batterica e della biologia delle popolazioni; l'aumentata disponibilità e la diminuzione del costo della determinazione della sequenza nucleotidica e gli sviluppi della tecnologia informatica, specificamente lo sviluppo di Internet come un efficiente, istantaneo e conveniente mezzo di scambio di informazioni (Maiden, 2006). MLST si basa sul sequenziamento di un certo numero di geni essenziali o geni *housekeeping* diffusi in tutto il cromosoma batterico (Helgason *et al.*, 2004). Gli schemi MLST sono stati sviluppati per la maggior parte dei batteri patogeni, oltre a *Neisseria meningitidis*, anche per *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecium*, *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella*, e altri schemi sono stati sviluppati per molte altre specie (Helgason *et al.*, 2004). La possibilità di avere sequenze genomiche complete per la maggior parte dei batteri patogeni, e di molti altri batteri, facilita notevolmente la progettazione di schemi MLST, in quanto consente di individuare i loci candidati MLST da sequenze genomiche annotate e la progettazione, quindi, di *primer* per la loro amplificazione e sequenziamento mediante PCR. I loci ricercati con MLST codificano per proteine che sono sotto forte pressione selettiva per la conservazione di funzioni metaboliche ma sufficientemente diversificate da identificare più varianti all'interno della popolazione bersaglio. L'individuazione di variazioni genetiche in diversi *loci* permette di definire per ogni *locus* un allele, la combinazione dei quali genera per ogni ceppo il relativo ST (*Sequence Type*). L'analisi di tali informazioni permette di determinare le relazioni filogenetiche tra i ceppi in

esame, mediante la creazione di un albero filogenetico basato sulle sequenze concatenate di tutti i *loci* genici analizzati per ogni ceppo (concatenamento). Questi codici sono indicati come profilo allelico o tipo di sequenza (ST). Ciascun ST rappresenta una sequenza unica di nucleotidi e riassume un grande volume dei dati di sequenza nucleotidica. Per quanto riguarda *Bacillus cereus* un database di sequenze MLST è ad oggi disponibile e presenta 1727 isolati (www.pubmlst.org/bcereus/, aggiornato al 29/04/2015) e 1008 profili MLST (www.pubmlst.org/bcereus/, aggiornato al 23/04/2015). Nel 2004 Helgason *et al.*, hanno sviluppato uno schema MLST il quale ha permesso di discriminare due ceppi di *B. cereus* associati a malattie nell'uomo, non potenzialmente discriminabili con il metodo MLEE, confermando quindi, che MLST è uno strumento utile per determinare la sorgente di un'infezione. MLST è stato applicato, sempre per *B. cereus*, anche nella ricerca di tossine da isolati di origine alimentare (Cardazzo *et al.*, 2008).

1.4.2 Analisi Next Generation Sequencing (NGS)

Il crescente sviluppo che negli ultimi anni ha interessato queste nuove tecnologie di sequenziamento, ha rivoluzionato il modo di condurre gli studi di ecologia microbica. Il principale passo in avanti offerto dalle tecnologie NGS è la capacità di produrre un grande volume di dati ad un prezzo economico (Metzker, 2010).

Le piattaforme che vengono impiegate attualmente nei progetti di sequenziamento si caratterizzano per una elevata processività, accuratezza dei dati di sequenza (oltre il 99 % per alcune piattaforme) e costi sostanzialmente ridotti rispetto ai sequenziatori ad elettroforesi capillare basati sulla biochimica di Sanger. Il vantaggio di queste tecnologie è infatti la possibilità di ottenere la sequenza di DNA amplificando il frammento, senza quindi doverlo clonare.

Oltre alle grandi piattaforme come l'*HiSeq* 2500 (Illumina), che restituisce un *output* di oltre 600 Gb (per questo motivo viene comunemente impiegata nei progetti di sequenziamento genomico) e il *Solid* 5500 W che ha un *output* di 320 Gb, sono attualmente presenti sul mercato sequenziatori più contenuti come il *Personal Genome Machine* (PGM, *Life Technologies*) e il *MiSeq* (Illumina) che hanno un *output* inferiore (da 2 a 15 Gb), ma sono molto versatili per diverse applicazioni.

Sebbene si differenzino per il tipo di chimica e per i metodi di acquisizione e di elaborazione dei dati, le piattaforme NGS sono accomunate da un *work-flow* operativo simile che prevede tre fasi principali:

1. Preparazione del template;
2. Sequenziamento e *imaging*;
3. Analisi bioinformatica dei dati.

1.4.2.1 Piattaforma Illumina

Nel 2006 la *Solexa* ha rilasciato l'Analizzatore Genomico (GA), nel 2007 l'azienda è stata acquistata dall'Illumina. All'inizio l'*output* dell'analizzatore era di 1 Gb per *run*, portato poi a 50 Gb per *run* nel 2009.

Nel 2010 viene rilasciato l'*HiSeq* 2000, che utilizza le stesse strategie del predecessore, arrivando però a 600 Gb per *run*, *output* ottenibile in 8 giorni.

Anche la lunghezza delle *reads* è stata migliorata, passando da 35 bp a circa 200 bp nelle ultime versioni.

Una delle ultime novità Illumina è il *MiSeq* che, a seconda della chimica utilizzata, consente di ottenere dati dalle librerie di DNA in un minimo di 4 ore fino ad un massimo di 2,5 giorni.

1.4.2.2 Tecnologie di sequenziamento Illumina

- **Amplificazione clonale della libreria**

La prima fase, in comune alle altre piattaforme di sequenziamento, consiste nella costruzione di una libreria di DNA a partire da quantità variabili di DNA genomico (3-20 µg). In questa fase il DNA viene frammentato e marcato con particolari sequenze nucleotidiche fondamentali per il processo di sequenziamento e per le successive analisi bioinformatiche, come i *primer* di sequenziamento ed i *barcode* (*index*).

Gli strumenti NGS Illumina hanno sistemi di analisi dei dati di immagine che non sono in grado di rilevare emissioni di fluorescenza da singole molecole, per cui la pre-amplificazione dei templati, tramite PCR, permette di generare un segnale di fluorescenza sufficientemente intenso da poter essere rilevato dallo strumento.

L'amplificazione della libreria consente di ottenere milioni di copie identiche (cloni) delle molecole che compongono la libreria.

Con i sistemi Illumina l'amplificazione della libreria è detta in fase solida e prevede dapprima il legame dei *primer* e l'estensione della molecola di template a singolo filamento sulla superficie di un vetrino. Successivamente, le molecole di template immobilizzate sul vetrino vengono amplificate con un meccanismo a ponte (*bridge* PCR) generando 100-200 milioni di *clusters* fisicamente separati aventi un'estremità libera su cui viene ibridizzato il *primer* specifico per la reazione di sequenziamento (Metzker. 2010).

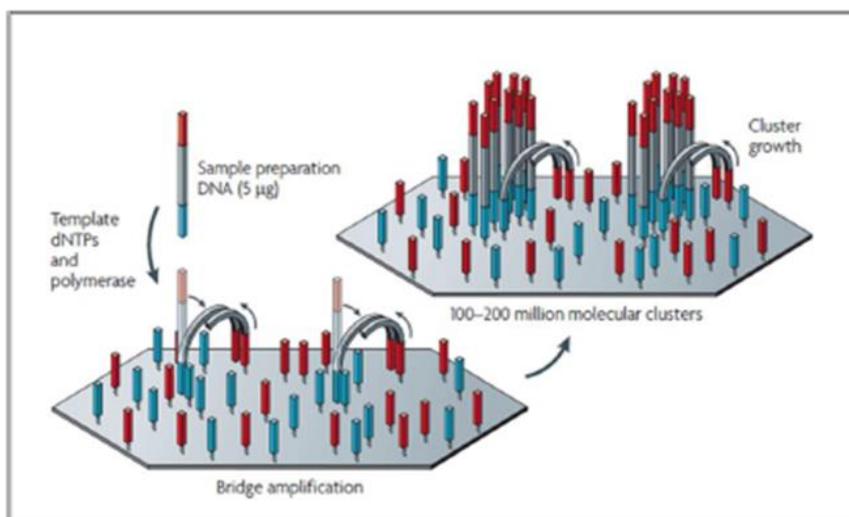


Figura 2: Amplificazione in fase solida (Metzker. 2010).

- **Sequenziamento e *imaging***

Il sequenziamento ciclico con terminatori reversibili (CRT) si compie in un numero variabile di cicli ciascuno dei quali si compone di (I) una fase di incorporamento di nucleotidi terminatori, modificati e marcati con fluorocromi, ad opera di una DNA polimerasi, (II) sintesi di una nuova catena complementare al template, (III) acquisizione del segnale di fluorescenza tramite *imaging* e rimozione (*cleavage*) dei terminatori (Figura 3).

Nel sequenziamento CRT i terminatori reversibili possono essere bloccati oppure non bloccati in posizione 3'.

Le piattaforme Illumina associano la metodica di amplificazione clonale in fase solida al metodo di sequenziamento con terminatori reversibili bloccati reversibilmente in 3' da fluorocromi specifici per ciascun nucleotide. L'inserimento di una base da parte della DNA polimerasi causa l'arresto della sintesi durante la quale il segnale di fluorescenza base-specifico viene acquisito in contemporanea per i quattro fluorocromi ("*four-colour imaging*"). Il clivaggio successivo rimuove i fluorocromi terminatori e ripristina il gruppo ossidrilico in 3' permettendo alla polimerasi di proseguire nella sintesi della catena in un nuovo ciclo di sequenziamento. Il principale limite di questo approccio è dato dagli errori di incorporazione dei nucleotidi modificati in 3', che porta alla determinazione di false variazioni di singoli nucleotidi, con un'elevata percentuale di errore che si verifica quando la base incorporata è una G. I nucleotidi bloccati richiedono, inoltre, l'utilizzo di una DNA polimerasi mutagenizzata che sia in grado di incorporare in modo efficace le basi modificate.

I terminatori reversibili non bloccati in 3' vengono incorporati in modo più efficace e consentono l'utilizzo di una DNA polimerasi non mutagenizzata. La differenza principale tra i due tipi di

terminatori è che l'arresto della sintesi della catena si verifica dopo l'incorporamento di ogni singolo nucleotide (Metzker. 2010).

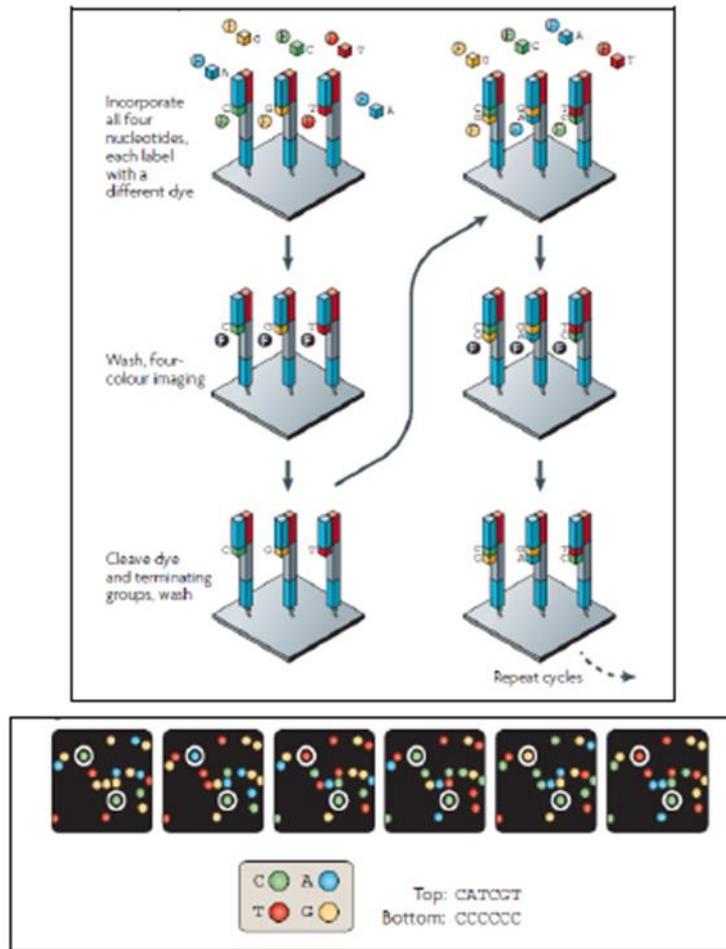


Figura 3: Sequenziamento *Cyclic reversible termination* CRT (Metzker. 2010).

1.4.3 Studio delle comunità microbiche negli alimenti con tecniche *Next Generation Sequencing* (NGS)

Nello studio delle comunità microbiche, i tradizionali metodi colturali sono considerati parziali e hanno dei tempi di risposta piuttosto lenti. I metodi molecolari, invece, permettono una rapida rilevazione dei microrganismi alteranti e inoltre contribuiscono a un miglioramento della qualità dei prodotti lattiero-caseari e ad una riduzione dei costi (Daniel J.O'Sullivan *et al.*, 2013).

Le analisi di sequenziamento di nuova generazione rappresentano un grande miglioramento rispetto al tradizionale sequenziamento *Sanger* nell'ambito della caratterizzazione delle comunità microbiche (Morozova and Marra, 2008).

Uno dei principali vantaggi della sostituzione dei metodi colturali sta nel fatto che molti microrganismi sono difficilmente isolabili con i comuni metodi colturali, quindi portano tendenzialmente ad una sottostima significativa delle comunità microbiche presenti nella matrice alimentare (Quigley *et al.*, 2011).

Il *Next Generation Sequencing* può essere applicato a specifici geni bersaglio, come il gene 16S rRNA, nonché a tutti i genomi (metagenomica) e ai trascritti (metatrascrittomica) dei batteri di una comunità. In questo modo è possibile determinare le proporzioni relative e i ruoli delle diverse popolazioni microbiche all'interno delle popolazioni complesse (O'Flaherty *and* Klaenhammer. 2011). Tali approcci vengono utilizzati sempre più comunemente nella caratterizzazione delle comunità degli alimenti, come quelle dei formaggi.

La qualità dei formaggi, infatti, dipende principalmente dal loro profilo microbico, in quanto i microrganismi contribuiscono non solo all'aroma ma anche ai difetti del prodotto stesso. Il sequenziamento del genoma di tutti i batteri presenti permette di comprendere meglio le relazioni dei microrganismi all'interno della matrice alimentare (O'Flaherty *and* Klaenhammer. 2011) e di evidenziare i microrganismi che sono in grado di causare difetti nei prodotti lattiero caseari ed i batteri che migliorano o proteggono il prodotto.

2. SCOPO

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la composizione microbica delle Ricotte industriali prodotte dal Caseificio “Elda” (VR) al fine di monitorare la qualità durante la presunta *shelf-life* del prodotto.

In particolare questo studio è volto a:

- integrare metodiche coltura-dipendenti con analisi coltura-indipendenti, per stabilire un background di conoscenze microbiologiche e per avere un’idea di come i tempi di conservazione possano modificarne la qualità delle Ricotte;
- applicare l’analisi *Next Generation Sequencing* (NGS) ai campioni di Ricotta per caratterizzare la composizione microbica durante la *shelf-life*;
- applicare la metodica *Multilocus Sequence Typing* (MLST) per identificare la specie e il ceppo responsabili della colorazione “Rosa” in Ricotta, nonché investigarne la produzione di tossine.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni analizzati

Le Ricotte analizzate in questo studio sono state fornite dal caseificio “Elda” (VR) che nel luglio 2014 ci ha consegnato 26 Ricotte da 250g, lotto L182. I campioni sono stati conservati per 60 giorni in frigorifero a 8 °C (che simula la condizione di conservazione casalinga) per valutare la qualità microbiologica lungo la *shelf-life* ed oltre la data di scadenza. La *shelf-life* stimata per la Ricotta industriale pastorizzata è di 20-40 giorni (Mucchetti *et al.*, 2002). A tempi prestabiliti di 4, 11, 14, 18, 21, 25, 32, 39 e 60 giorni dalla data di produzione sono state prelevate 3 confezioni di Ricotta (4 nel caso di osservate anomalie) che sono state analizzate con metodiche microbiologiche classiche e molecolari. Ogni campione di Ricotta è stato nominato con il giorno di produzione e un numero progressivo.

3.2 Preparazione campioni

Ad ogni campionamento sono stati prelevati 20 g di Ricotta, posti in sacchetti da Stomacher (*Neustadt*) e addizionati con un volume di 180 ml di MRD (*Maximum Recovery Diluent; Biokar Diagnostics*); l'MRD contiene peptone e permette di conservare il campione e mantenere vitali i microrganismi inibendo però la loro moltiplicazione nelle due ore successive dalla prima diluizione. I sacchetti sono stati sottoposti ad azione dello Stomacher (*Stomacher® 400 Circulator*) per 15 secondi a 230 rpm (rotazioni per minuto); la sospensione ottenuta è stata diluita serialmente 1:10 a seconda del tipo di terreno da utilizzare. Per *Milk PCA* solitamente le diluizioni di interesse erano quelle comprese tra 10^{-5} e 10^{-9} ; mentre per CFC e *Milk PCA* più amido le diluizioni erano comprese tra 10^{-2} e 10^{-4} . Ad ogni campionamento è stata inoltre conservata un po' di Ricotta in tubi *falcon (Sarstedt)* a +8 °C, per osservare possibili modificazioni cromatiche nel tempo.



Foto 2: Fase in cui viene pesata la Ricotta e aggiunto l'MRD.

Per ogni campione è stato misurato il valore di pH, tramite pHmetro (*CRISON pH-meter BASIC 20⁺*) direttamente nella confezione di ricotta.

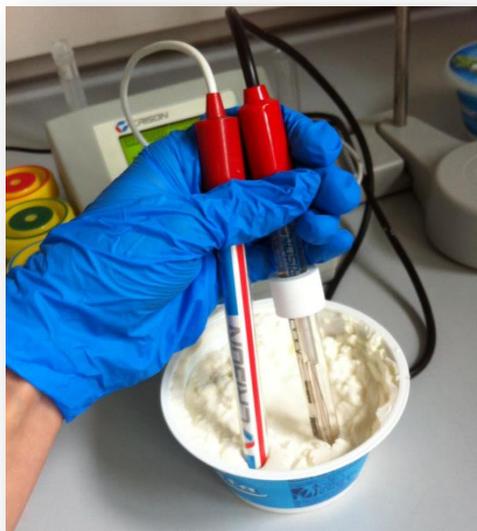


Foto 3: Misurazione del pH.

Inoltre, da ogni campione sono stati prelevati 500 mg di Ricotta che sono stati posti in provette *ependorf* da 2 ml con tappo a vite (*Sarstedt*) per l'estrazione del RNA.

3.3 Analisi microbiologica

L'analisi microbiologica aveva lo scopo di definire la concentrazione ed il tipo di microrganismi presenti nel campione. La quantificazione della carica batterica mesofila totale dei campioni è stata eseguita seminando le diluizioni del campione omogenato in *Milk PCA*. Questo terreno permette la crescita di tutti i batteri vitali (spore e non) presenti nel campione. Tuttavia con questo metodo non è possibile quantificare le sole spore in quanto potrebbero germinare assieme agli altri batteri confondendosi nella piastra. Per poter quindi, quantificare le spore, abbiamo inattivato col calore tutti i batteri vivi nel campione omogenato (fase di termizzazione), e si procede quindi con la semina su piastra.

Partendo dall'omogenato, che rappresenta la nostra concentrazione più alta, si è proseguito facendo delle diluizioni seriali 1:10. Tali diluizioni sono state scelte in base alla carica microbica riscontrata dallo stesso laboratorio interno al caseificio durante le normali analisi microbiologiche.

Per effettuare la conta delle spore aerobiche, il trattamento termico è stato effettuato a 80 °C per 10 minuti in termoblocco (*Stuart Block Heather SBH 130D*), successivamente i campioni sono stati messi in ghiaccio per 5 minuti per poi essere posti a temperatura ambiente. Si è proceduto, quindi, con le diluizioni seriali 1:10 in MRD fino alla diluizione di interesse. La semina è stata eseguita per inclusione di 1 ml della diluizione di interesse.

Le piastre Petri così inoculate sono state conservate alle determinate temperature (vedi Tabella 2) e trascorsi 3-4 giorni ne è stata valutata la crescita visiva.

Il numero di CFU/g (unità formanti colonia per grammo campione) è stato stimato mediante la formula:

$$N = \sum C / [V (n1 + 0,1 n2) d]$$

dove:

$\sum C$ = Somma delle colonie contate nelle due piastre consecutive;

V = Volume impiegato per l'inoculo;

n1 e n2 = numero di piastre impiegate alla prima e alla seconda diluizione considerate;

d = prima diluizione considerata nella conta (la più concentrata).

Campione	Data	Analisi microbiologica		
		mPCA	mPCA amido	CFC
3 ricotte a 4 giorni di shelf-life	04/07/14	+	+	
3 ricotte a 11 giorni di shelf-life	11/07/14	+	+	
3 ricotte a 14 giorni di shelf-life	14/07/14	+	+	
3 ricotte a 18 giorni di shelf-life	18/07/14	+	+	
3 ricotte da 21 giorni di shelf-life	21/07/14	no analisi microbiologica		
3 ricotte da 25 giorni di shelf-life	25/07/14	+	+	+
3 ricotte da 32 giorni di shelf-life	01/08/14	no analisi microbiologica		
3 ricotte da 39 giorni di shelf-life	08/08/14	+	+	
3 ricotte da 60 giorni di shelf-life	29/08/14	+	+	+

Tabella 1: Tabella riassuntiva analisi microbiologiche.

Terreno	Temperatura di incubazione	Scopo
<i>Plate Count Agar with skimmed Milk</i> (Milk PCA; Biokar diagnostics)	30°C	Carica batterica mesofila (CBM).
<i>CFC Pseudomonas Agar Base</i> (Biolife)	22°C o temperatura ambiente	Terreno di base e supplementi selettivi per l'isolamento ed il conteggio di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e di <i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Plate Count Agar with skimmed Milk + amido 0,2%</i> (Milk PCA; Biokar diagnostics)	30°C	Spore aerobie.

Tabella 2: Tabella riassuntiva dei terreni utilizzati in questo studio.

- **Stoccaggio delle colonie**

Durante l'analisi microbiologica, sono state selezionate e stoccate alcune colonie, morfologicamente diverse tra loro o aventi particolari caratteristiche fenotipiche, per l'analisi molecolare. Le colonie selezionate sono state stoccate a -80 °C in 750 µl di TSB e 750 µl glicerolo.

- **Isolamento delle colonie pigmentate**

Al quarto e quinto campionamento, rispettivamente al 14esimo e 18esimo giorno di *shelf-life*, due Ricotte presentavano una colorazione “Rosa” chiaro superficiale e non troppo estesa (chiamate Ricotte E6 ed E9). È stata così prelevata la zona interessata di E9 e piastrata a seguito di una diluizione o direttamente mediante la metodica dei quattro quadranti sui terreni CFC per *Pseudomonas spp.*, MSA (*Mannitol Salt Agar, Biolife*) per la ricerca di Stafilococchi, OGYE (*Oxytetracycline Glucose Yeast Extract, Micorbiol*) per l'isolamento di lieviti e muffe, Milk PCA per la determinazione della carica batterica mesofila totale, TSA-G (*Tryptic Soy Agar, Merck Millipore*) è un terreno non selettivo, arricchito di glucosio, utilizzato per la crescita di colonie separate.



Foto 4: Ricotta E9 con colorazione “Rosa”.

Inoltre per alcune diluizioni del campione E6 è stata effettuata una semina in terreno minimo MBM, in grado di promuovere la produzione del pigmento in certe specie batteriche come *Pseudomonas fluorescens*, a 22 °C (Andreani *et al.*, 2014).

Per verificare che una o più colonie fossero responsabili della pigmentazione, le colonie cresciute su terreno TSA-G, che presentavano quattro morfologie diverse chiamate B1, B2, B3 e B4 sono state prelevate e cresciute *over night* a 30 °C in 1.5 ml di TSB. 100 µl della coltura liquida sono stati inoculati in ricottine industriali con *shelf-life* simile alle Ricotte del Caseificio “Elda”. Inoltre le colonie B1, B3 e B4 sono state prelevate direttamente dalla piastra, stemperate in 100 µl di TSB, diluite 1:2 e inoculate (100 µl) sterilmente in tre ricottine “Elda”. Successivamente le colonie B1 e B3, che conferivano la colorazione alle Ricotte, e B2 sono state ripassate in CFC, OGA (*Oxitetracycline Glucose Agar, Kairosafe*) per la ricerca di lieviti e MYP (*Bacillus cereus MYP Agar Base, Kairosafe*) per Bacilli, in duplicato a 22°C e 8°C.

3.4 Analisi molecolare

3.4.1 Analisi delle comunità microbiche della Ricotta tramite sequenziamento Illumina

3.4.1.1 Estrazione RNA

Per ogni campione di Ricotta sono stati pesati con la bilancia di precisione (*Sartorius*) 500 mg.

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata con *RNeasy® Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)*.

Il campione è stato risospeso in 700 µl di *buffer* RLT, 7 µl di β-mercaptoetanol e circa 250 µl di biglie di Zirconio (*BioSpec Products*). Il tutto è stato omogeneizzato al *Ribolyzer (Hybaid)* per 20 secondi a velocità 4. E' stata eseguita una centrifugazione per 10 secondi alla massima velocità al termine della quale sono stati prelevati circa 700 µl di surnatante e trasferiti in nuove *eppendorf*.

Nelle provette contenenti il lisato sono stati aggiunti circa 700 μ l di etanolo 70 %, il contenuto è stato mescolato delicatamente per inversione e successivamente 700 μ l della soluzione ottenuta sono stati trasferiti in nuovi tubini contenenti le colonnine fornite dal *kit*. È stata eseguita una centrifugazione a massima velocità per 15 secondi con successiva eliminazione dell'eluito. L'operazione è stata ripetuta una seconda volta con il rimanente volume. Ad ogni colonnina sono stati aggiunti 350 μ l di *buffer* RW1, centrifugando poi alla massima velocità per 15 secondi ed eliminando l'eluito. Sono stati aggiunti 80 μ l soluzione contenente *DNasi* diluita in *buffer* RDD e i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 15 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 350 μ l di *buffer* RW1 ed è stata eseguita una centrifugazione a massima velocità per 15 secondi e successiva eliminazione dell'eluito. In ciascuna colonna sono stati inseriti 500 μ l di *buffer* RPE ed è stata eseguita una centrifugazione a massima velocità per 15 secondi con successiva eliminazione dell'eluito. Questo passaggio è stato ripetuto una seconda volta aumentando il tempo di centrifugazione a 2 minuti. Allo scopo di eliminare i residui di etanolo è stata effettuata una centrifugazione a vuoto per un minuto alla massima velocità. Successivamente i filtri sono stati trasferiti in nuove provette *ependorf* e sono stati aggiunti 30 μ l di acqua *RNasi free*. L'eluito è stato ripescato e ripassato in colonna. È stata infine eseguita una centrifugazione a 10000 rpm per 1 minuto. L'eluito contenente RNA è stato conservato a -80°C.

✓ **Quantificazione al μ DRIP**

L'RNA purificato è stato quantificato al μ DRIP (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). La fotometria ad UV è un modo comune per quantificare gli acidi nucleici in un campione. Sia il DNA che RNA assorbono luce UV in modo molto efficiente, permettendo di rilevare e quantificare le concentrazioni. Questo strumento permette di leggere a 3 lunghezze d'onda: 230 nm, 260 nm e 280 nm. A differenza degli acidi nucleici, le proteine hanno un UV massimo di assorbimento (Abs) a 280 nm, soprattutto a causa dei residui di triptofano. Pertanto, il rapporto Abs260/Abs280 fornisce una stima della contaminazione di proteine nel campione. Per un campione di buona qualità, il valore dovrebbe essere compreso tra 1.8 e 2.0. Un valore minore di 1.8 indica la presenza di proteine e un valore superiore a 2.0 indica una probabile contaminazione, quali fenoli. Un altro parametro comune utilizzato per descrivere la qualità del DNA è il rapporto tra 260 nm e 230 nm. Questo parametro viene usato per stimare la contaminazione chimica, come fenoli, carboidrati o un'elevata concentrazione di sale. L'ideale rapporto 260/230 nm è di circa 2. Sono stati controllati 2,5 μ L di RNA purificato di ciascun campione, inserendo un controllo interno composto da acqua *RNasi free*.

3.4.1.2 Retrotrascrizione RNA

La retrotrascrizione (o trascrizione inversa) è la reazione effettuata da parte di un particolare enzima, chiamato trascrittasi inversa, che porta alla sintesi di una molecola di DNA complementare (cDNA) a partire da RNA. La retrotrascrizione dell'RNA è stata eseguita utilizzando il kit *SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen)*. Il protocollo è stato applicato ad ogni campione in duplicato aggiungendo l'enzima trascrittasi inversa (campioni RT: retrotrascritti) o senza l'aggiunta dell'enzima (campioni noRT: non retrotrascritti). I campioni noRT sono stati utilizzati come controllo negativo per valutare l'eventuale presenza di tracce di DNA non proveniente dalla retrotrascrizione nei campioni in esame. Poiché solitamente abbiamo ottenuto rese di estrazione basse a causa della complessità della matrice in esame, il campione non è stato diluito e si è partiti dai 10 µL di RNA totale. Ad ogni campione sono stati aggiunti 2 µL di mix1 contenente:

- 1µL *Random Hexamers (RH)*
- 1µL *dNTPS 10mM*

Le provette sono state riscaldate a 65 °C per 5 minuti e poi poste in ghiaccio per 2 minuti.

Ad ogni campione sono stati aggiunti 7 µL di mix2 costituita da:

- 4µL *Buffer 5X*
- 2µL *DTT (1mM)*
- 1µL *RNase OUT 40U/µL*

Si è poi proceduto con una incubazione di 2 minuti a 25 °C, poi ad ogni campione RT è stato aggiunto 1 µL di *SuperScript™ II RT*. Il campione è stato poi sottoposto al ciclo termico a 25 °C per 10 minuti e successivamente a 42 °C per 50 minuti. La reazione è stata inattivata mediante riscaldamento a 70 °C per 15 minuti.

3.4.1.3 *Real-Time* PCR per controllare la qualità dell'estrazione

La PCR quantitativa (qPCR, RT-PCR o *Real-Time*PCR) è in grado di misurare in tempo reale la concentrazione iniziale di una sequenza target in un campione biologico. La *Real-Time* PCR è una PCR in cinetica in cui l'amplificazione ed il rilevamento dell'amplificato avvengono nello stesso momento. Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di una molecola fluorescente, che dà la possibilità di seguire la reazione da un punto di vista visivo, grazie all'ausilio di appositi *software*.

In questo studio la metodica di *Real-Time* PCR è stata utilizzata per poter escludere completamente la possibile presenza di DNA genomico nei campioni di RNA estratti.

Questa tecnica è considerata molto efficiente e molto sensibile, inoltre permette di rilevare gli acidi nucleici anche se in quantità molto ridotte.

Per la reazione di *Real-Time* PCR è stata utilizzata la master mix *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)*. È una miscela di reazione contenente *SYBR Green*, *Platinum Taq* DNA polimerasi (60 U/ml), MgCl₂ (6 mM), uracil-DNA glicosidasi (UDG, 40 U/ml), dNTPs (40 mM), Tris-HCl (pH 8.4), KCl (100 mM).

Da precedenti studi, si è deciso di applicare anche in questo caso diluizioni seriali da 1:100 a 1:200 del cDNA di ogni campione che hanno permesso di ottenere degli amplificati di buona qualità senza dimeri di *primer*. Sono stati utilizzati *primer* 16S *bact* (Nadkarni *et al.*, 2009; *Eurofins MWG Operon*) che amplificano segmenti di 467 bp.

Primer	Sequenza
16S-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT
16S-R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT

Tabella 3: Sequenze dei *primer* utilizzati per l'analisi *Real-Time* PCR.

Nei pozzetti di una piastra da *Real-Time* PCR (*Fortitude*) sono stati distribuiti 7.5 µl di mix di reazione e 2,5 µl di campione opportunamente diluito.

Reagenti	Concentrazione reagenti	Quantità (µl)
Mastermix 2X	1X	5
Primer forward 10 µM	0.5 µM	0.5
Primer reverse 10 µM	0.5 µM	0.5
H₂O		1.5

Tabella 4: Composizione della miscela di reazione per singolo campione, con le relative concentrazioni e le quantità, espresse in µl, per un volume finale di 10 µl.

La piastra è stata inserita nella macchina da PCR (*Roche Light Cycler® 480*) ed è stato impostato il protocollo di amplificazione che prevede:

Temperatura	Tempo	N° cicli
50 °C	2 minuti	1 ciclo
95 °C	10 minuti	1 ciclo
95 °C 60 °C	10 secondi 1 minuto	45 cicli

Tabella 5: Ciclo termico impiegato per lo svolgimento della *Real-Time PCR* in questo studio.

Ogni misurazione è stata eseguita in duplicato e per ogni esperimento è stato inserito un controllo negativo composto da sola acqua. Al termine dell'amplificazione i risultati sono stati elaborati da un *software*, in questo modo è stato possibile effettuare un'analisi della curva di *melting* e dei relativi *cp* (cioè il punto in cui la curva ha la massima pendenza; in questo punto viene effettuata la quantificazione) per interpretare la qualità e la quantità del DNA dei campioni.

3.4.1.4 Costruzione librerie 16S Illumina

Studi di metagenomica sono comunemente eseguiti analizzando la regione 16S rRNA ribosomiale dei procarioti lungo circa 1.500 bp che contiene nove regioni variabili intercalate da regioni conservate.

Queste regioni variabili di 16S rRNA sono spesso utilizzate nelle classificazioni filogenetiche e tassonomiche.

Il protocollo Illumina utilizzato in questo studio descrive un metodo per il sequenziamento delle regioni variabili V3 e V4 del gene 16S rRNA o per il sequenziamento di altre regioni utilizzando *primer* specifici per la regione stessa.

✓ Preparazione delle librerie con il metodo “Two step PCR” Illumina

1° STEP

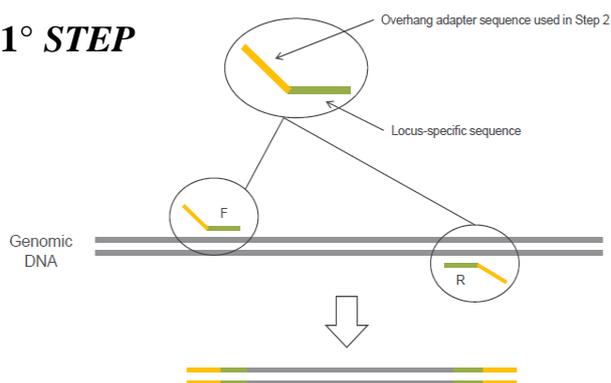


Figura 4: Primo *step* del processo di creazione di librerie attraverso il metodo “*Two steps PCR*” Illumina.

Questo approccio consiste in una prima reazione di PCR nella quale una coppia di primer progettati con delle “code” sporgenti, si ibridano a monte e a valle della specifica regione di interesse.

2° STEP

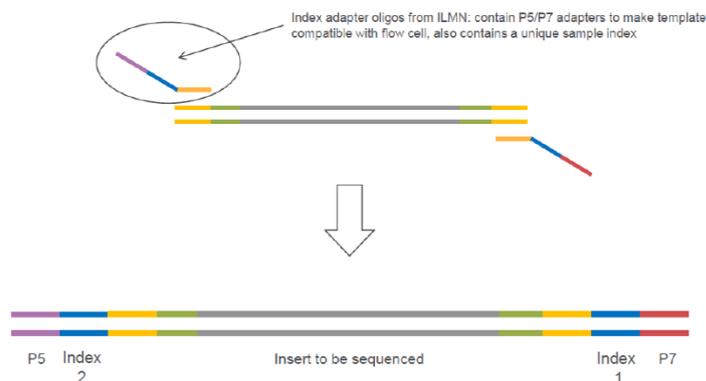


Figura 5: Secondo *step* del processo di creazione di librerie attraverso il metodo “*Two steps PCR*” Illumina.

Un secondo *step* di PCR viene eseguito con *primer* contenenti delle sequenze *index* (o *barcode*) specifiche per ciascun campione e degli adattatori per il sequenziamento Illumina. Infine le librerie vengono normalizzate e unite per poi essere sequenziate con il *MiSeq*.

✓ 1° Step di PCR per la produzione di ampliconi

Per questa prima PCR è stata utilizzata *KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)* (*Kapa biosystems*) contenente DNA polimerasi, *buffer* di reazione, dNTPs (0.3 mM ognuno) e $MgCl_2$ (2.5 mM).

In ogni campione il volume della miscela di reazione era pari a 25 μ l. I reagenti utilizzati sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 6), con le relative concentrazioni finali.

Reagenti	Concentrazione reagenti	Quantità (μ l)
KAPA ReadyMix 2X	1X	12.5
Primer forward 1 μ M	0.2 μ M	5
Primer reverse 1 μ M	0.2 μ M	5
DNA (5 ng/ μ l)	12.5 ng	2.5

Tabella 6: Composizione della miscela di reazione per singolo campione, con le relative concentrazioni e le quantità, espresse in μ l, per un volume finale di 25 μ l.

I *primer* utilizzati sono i seguenti:

Primer	Sequenza
16S-F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
16S-R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Tabella 7: *Primer* degenerati utilizzati per la prima reazione di PCR con attaccate le code sporgenti (in rosso) necessarie al successivo *step* di PCR.

La reazione di amplificazione è stata condotta in termociclatore (*Mastercycler, Eppendorf*) con il seguente ciclo termico:

Temperatura	Tempo	N° cicli
95 °C	3 minuti	1 ciclo
95 °C	30 secondi	25 cicli
55 °C	30 secondi	
72 °C	30 secondi	
72 °C	5 minuti	1 ciclo

Tabella 8: Ciclo termico impiegato per lo svolgimento della prima PCR.

✓ PCR clean up

La purificazione del prodotto di amplificazione è stata eseguita con *AMPure XP beads (Beckman Coulter)*.

Sono state aliquotate 20 µl di biglie in ciascun pozzetto e il contenuto è stato poi mescolato delicatamente per 10 volte lasciando poi in incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti. Al termine dell'incubazione la piastra è stata posta in un supporto magnetico per 2 minuti al termine dei quali è stato eliminato il surnatante, mantenendo la piastra sul supporto magnetico e facendo attenzione a non prelevare anche le biglie. E' stato eseguito un primo lavaggio con etanolo 80 % aliquotando in ogni pozzetto 200 µl di etanolo 80 %, incubando la piastra sul supporto magnetico per 30 secondi e infine eliminando il surnatante. E' stato eseguito un secondo lavaggio con etanolo 80 % come descritto sopra facendo però molta attenzione nel rimuovere ogni residuo di etanolo nella fase di eliminazione del surnatante. La piastra è stata poi incubata per circa 10 minuti sul supporto magnetico per permettere alle biglie di asciugarsi. Al termine dell'incubazione è stata rimossa la piastra dal supporto magnetico e in ogni pozzetto sono stati aggiunti 52,5 µl di Tris 10 mM pH 8,5, il contenuto è stato mescolato delicatamente per 10 volte o comunque fino a quando le

biglie risultassero completamente risospese. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 2 minuti e successivamente riposta sul supporto magnetico per almeno 2 minuti al termine dei quali sono stati prelevati 50 µl di surnatante da ogni pozzetto e trasferiti in una nuova piastra.

✓ 2° Step di PCR

Questa seconda PCR è stata eseguita sul prodotto di amplificazione purificato risultante dalla prima PCR, al fine di indicizzare i diversi campioni e fornire gli adattatori necessari per il sequenziamento con *MiSeq*.

I *primer* utilizzati in questa fase sono i *Nextera XT Index 1 Primers* (Illumina) la cui diversa combinazione ha permesso di indicizzare i diversi campioni.

Index 1 (i7)	Sequenza	Index 2 (i5)	Sequenza
N701	TAAGGCGA	S501	TAGATCGC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATACCTCT
N704	TCCTGAGC	S504	AGAGTAGA
N705	GGACTCCT	S505	GTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGGAGTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N709	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	GTAGAGGA		

Tabella 9: *Nextera XT Index 1 Primer* utilizzati in diverse combinazioni in questo studio per l'indicizzazione dei campioni nel secondo *step* di PCR.

In ogni campione il volume della miscela di reazione era pari a 50 µl. I reagenti utilizzati sono riportati nella tabella seguente (Tabella 10), con le relative concentrazioni finali.

Reagenti	Quantità (µl)
KAPA ReadyMix 2X	25
<i>Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)</i>	5
<i>Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)</i>	5
DNA	5
H₂O	10

Tabella 10: Composizione della miscela di reazione per singolo campione, con le relative concentrazioni e le quantità, espresse in µl, per un volume finale di 50 µl.

L'amplificazione è stata condotta in termociclatore (*Mastercycler, Eppendorf*) con il seguente ciclo termico:

Temperatura	Tempo	N° cicli
95 °C	3 minuti	1 ciclo
95 °C	30 secondi	8 cicli
55 °C	30 secondi	
72 °C	30 secondi	
72 °C	5 minuti	1 ciclo

Tabella 11: Ciclo termico impiegato per lo svolgimento della seconda PCR.

Al termine di questa seconda PCR il prodotto di amplificazione è stato purificato con *AMPure XP beads* come visto prima e 25 µl di surnatante per ogni campione sono stati trasferiti in una nuova piastra.

✓ **Quantificazione, normalizzazione e pooling della libreria**

E' stata eseguita una quantificazione dei prodotti di amplificazione con tecnica fluorimetrica (*Qubit*) come consigliato da Illumina e in base alle concentrazioni rilevate, i campioni prima di essere uniti insieme, sono stati opportunamente diluiti utilizzando Tris 10 mM pH 8,5 e infine 5 µl di ogni campione sono stati uniti per eseguire la corsa *MiSeq. BMR genomics* ha provveduto inoltre al sequenziamento con lo strumento *MiSeq* con chimica *2X300 bp paired end* e all'analisi dei dati bioinformatici mediante il programma *QIIME 1.8 "Quantitative Insights Into Microbial Ecology"* (Caporaso *et al.*, 2010).

3.4.2 Identificazione di specie dei ceppi isolati da Ricotta "Rosa"

3.4.2.1 Estrazione DNA

Per lo studio dei ceppi produttori del pigmento "Rosa" le colture batteriche sono state strisciate in piastre Petri, contenenti TSA e incubate a 30 °C. Dopodiché è stata effettuata l'estrazione del DNA tramite la metodica di bollitura: questo metodo è molto semplice e nella maggior parte dei casi si ottengono buone rese di estrazione. Il metodo prevede di prelevare con un'ansa una singola colonia e trasferirla in una *ependorf* contenente 100 µl di acqua BDH (Acqua bidistillata purificata, *VWR We Enable Science*). Si procede con un trattamento termico a 95 °C per 10 minuti in termoblocco (*Omnigen Hybaid*) e centrifugazione a 14.000 rpm per 2 minuti (*Centrifuge 5424, Eppendorf*). Si preleva quindi il surnatante e lo si trasferisce in una nuova provetta. Il surnatante, dopo opportuna diluizione è stato utilizzato come template per la PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Nel caso in cui l'estrazione per bollitura non portava a buone rese, si è provveduto ad estrarre DNA tramite l'*Invisorb® Spin Tissue Mini Kit* (STRATEC molecular). Le colture batteriche sono state incubate a 30 °C in *falcon* contenenti TSB. Sono stati prelevati 2 ml di coltura batterica e trasferiti in *ependorf* e centrifugati a 4000 rpm. Dopo aver eliminato il surnatante sono stati addizionati 400 µl di *Lysis buffer* (*Invosorb*) e 40 µl di Proteinasi K (*Invosorb*) e il tutto è stato mescolato vigorosamente al *vortex*. Al fine di completare la lisi in modo ottimale, le provette sono state incubate in costante agitazione a 52 °C per un'ora. Successivamente le provette sono state centrifugate per 2 minuti a 11.000 rpm. Il surnatante è stato prelevato e trasferito in una nuova provetta in cui sono stati aggiunti 200 µl di *Binding buffer A* (*Invosorb*). Il tutto è stato mescolato al *vortex* per 10 secondi. La soluzione è stata successivamente trasferita in colonnina e lasciata incubare per 1 minuto. Dopo aver centrifugato a 11.000 rpm per 2 minuti, l'eluato è stato eliminato mentre il filtro è stato posto in una nuova *ependorf*. Infine sono stati aggiunti 550 µl di *Washing buffer* (*Invosorb*) e si è centrifugato a 11.000 rpm per 1 minuto. Dopo aver gettato il contenuto della provetta *ependorf* si è ripetuto il lavaggio con *Washing buffer*. Per eliminare eventuali tracce di etanolo è stata eseguita una centrifugazione alla massima velocità per 4 minuti. Dopo aver trasferito il filtro in una nuova provetta, sono stati trasferiti 100 µl di *Elution buffer* (*Invosorb*) preriscaldato. Dopo aver incubato per 3 minuti a temperatura ambiente è stata eseguita un'ulteriore centrifugazione a 11.000 rpm per 1 minuto. L'eluato è stato così conservato a -20 °C.

3.4.2.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Le metodiche molecolari si basano sull'amplificazione di sequenze genomiche specifiche che vengono definite marcatori genetici.

La PCR è una tecnica *in vitro* con la quale una molecola di DNA viene amplificata esponenzialmente per mezzo di una DNA-polimerasi-DNA dipendente. Il DNA da amplificare viene aggiunto a una *mix* di reagenti (*primer*, dNTPs, DNA polimerasi, tampone, sali di magnesio) che in opportune condizioni innescano la reazione di polimerizzazione.

Il motore della reazione è costituito dalle variazioni di temperatura che permettono al DNA di denaturarsi e quindi separare i due filamenti a cui possono legarsi i *primer* (*annealing*) dai quali l'enzima allunga il filamento nascente.

L'amplificazione dei filamenti si ottiene grazie alla ripetizione di cicli secondo un profilo termico che prevede tre stadi:

- 1) **Denaturazione:** la soluzione di DNA viene portata ad una temperatura compresa tra 94 e 99 °C e i filamenti di DNA si separano.
- 2) **Annealing:** 40-60 °C circa al fine di permettere l'appaiamento dei *primer* alle loro regioni complementari nei filamenti di DNA denaturati.

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

Alcune condizioni sono variabili:

Temperatura di *annealing*: varia a seconda del tipo di *primer* usato (lunghezza, contenuto in GC) e della stringenza desiderata;

Tempo di allungamento: dipende dalla lunghezza del frammento e dalla processività dell'enzima.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-35 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un *plateau* per carenza di *primer* o per diminuzione dei dNTPs (Dale, 2004). La PCR può essere usata come metodo di identificazione (es. PCR specie-specifica) o di tipizzazione (es. MLST, *multi-locus-sequence-type*).

3.4.2.2.1 PCR per l'identificazione di specie

Il DNA inizialmente è stato amplificato e sequenziato con i *primer* 16S (Tabella 3; Reagenti Tabella 13 e ciclo PCR Tabella 14 di Materiali e Metodi) su due campioni in quanto solo questi presentavano una colorazione "rosea". Lo stesso DNA è stato poi amplificato con dei *primer* specifici per il genere *Bacillus*, la cui funzionalità e specificità erano già state precedentemente testate nello stesso laboratorio.

Le seguenti PCR sono state condotte utilizzando l'enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega), il quale è posto in soluzione in un *buffer* contenente Tris-HCL 50 mM a pH 8.0 a 25 °C, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo al 50 % e Triton X-100 allo 0,1 %. Il Kit commerciale della Promega fornisce, inoltre, anche il *buffer* di reazione (*GoTaq® Flexi Buffer*) contenente KCL 50 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 9.0 a 25°C e Triton X-100 allo 0,1 %.

Questi *primer* sono specifici per la ricerca del gene *rpoB*, che codifica per la subunità β dell'RNA polimerasi batterica.

Primer	Gene	Tm (°C)	Lunghezza	Sequenza (5'→ 3')
			frammenti (bp)	
Bac-rpoB-F	<i>rpoB</i>	60.6	820	CGT GAC GTT CAC TAC TCT CAC TA
Bac-rpoB-R		63.2		ATG ATC GCA TCC TCG TAG TTR TAR CC
Bac2-rpoB-F	<i>rpoB</i>	60.9	953	GGT TAT AAC TAY GAG GAT GCS ATC AT
Bac2-rpoB-R		65.6		GCT TCA AGT GCC CAA ACY TCC ATC TC

Tabella 12: Sequenze dei *primer* utilizzati per l'amplificazione di *Bacillus*.

In ogni campione il volume della miscela di reazione era pari a 20 μ l. I reagenti utilizzati sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 13) con le relative concentrazioni finali.

Reagenti	Concentrazione reagenti	Quantità (μ l)
Buffer di reazione 5X	1X	4
MgCl₂ 25mM	2.5 mM	2
dNTPs 25 μM ognuno	0.25 μ M	0.2
Primer forward 10 μM	0.25 μ M	0.5
Primer reverse 10 μM	0.25 μ M	0.5
Taq Polimerasi 5U/μl	0.8 U	0.16
DNA 2 ng/μl	10 ng	2.5
H₂O BDH	Fino a 20 μ l	10.14

Tabella 13: Composizione della miscela di reazione per singolo campione, con le relative concentrazioni e le quantità, espresse in μ l, per un volume finale di 20 μ l.

I campioni sono stati amplificati nel termociclatore (*Applied Biosystem 2720*) con il seguente ciclo termico:

Temperatura	Tempo	Numero di cicli
94 °C	5 minuti	1
94 °C	30 secondi	35
60 °C	30 secondi	
72 °C	45 secondi	
72 °C	7 minuti	1

Tabella 14: Ciclo termico impiegato per lo svolgimento della PCR di *Bacillus*.

La corsa elettroforetica è stata svolta come riportato nel paragrafo 3.4.2.3 della sezione di Materiali e Metodi.

3.4.2.2.2 *Multilocus Sequence Typing* per l'identificazione di B1 e B3

Per la tipizzazione dei campioni identificati nella precedente analisi, si è proseguito lo studio con il metodo *Multilocus Sequence Typing*. L'approccio MLST è stato applicato ai campioni B1 e B3 utilizzando *primer* e condizioni riportate nella sezione *primer* del database MLST di *B.cereus* ([http:// pubmlst.org/b.cereus/](http://pubmlst.org/b.cereus/)).

Primer	Gene	Tm (°C)	Sequenza (5' →3')
glpF-F	<i>glpF</i>	57.3	GCG TTT GTG CTG GTG TAA GT
glpF-R		57.3	CTG CAA TCG GAA GGA AGA AG
gmK-R	<i>gmK</i>	55.9	GCA ATG TTC ACC AAC CAC AA
gmK-F		55.3	GCA ATG TTC ACC AAC CAC AA
ilvD-F	<i>ilvD</i>	55.3	CGG GGC AAA CAT TAA GAG AA
ilvD-R		57.3	GGT TCT GGT CGT TTC CAT TC
pta-F	<i>pta</i>	55.9	GCA GAG CGT TTA GCA AAA GAA
pta-R		55.3	TGC AAT GCG AGT TGC TTC TA
pur-F	<i>purH</i>	53.2	CTG CTG CGA AAA ATC ACA AA
pur-R		55.3	CTC ACG ATT CGC TGC AAT AA
pycA-F	<i>pycA</i>	57.3	GCG TTA GGT AAC GAA AG
pycA-R		55.3	CGC GTC CAA GTT TAT GGA AT
tpi-F	<i>tpi</i>	61.4	GCC CAG TAG CAC TTA GGA C
tpi-R		55.3	CCG AAA CCG TCA AGA ATA T

Tabella 15: Sequenze dei *primer* utilizzati per l'identificazione di B1 e B3.

La porzione dei geni *housekeeping* di *glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* e *tpi* è stata amplificata utilizzando il DNA estratto da coltura pura di ogni campione.

In ogni campione il volume della miscela di reazione era pari a 20 µl. I reagenti utilizzati sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 16), con le relative concentrazioni finali.

Reagenti	Concentrazione reagenti	Quantità (µl)
Buffer di reazione 5X	1X	4
MgCl2 25mM	2.5 mM	2
dNTPs 25 µM ognuno	0.25 µM	0.2
Primer forward 10 µM	0.125 µM	0.25
Primer reverse 10 µM	0.125 µM	0.25
Taq Polimerasi 5U/µl	1U	0.2
DNA 2 ng/µl	10 ng	5
H2O BDH	Fino a 20 µl	8.1

Tabella 16: Composizione della miscela di reazione per singolo campione, con le relative concentrazioni e le quantità, espresse in µl, per un volume finale di 20 µl.

I campioni sono stati amplificati nel termociclatore con il seguente ciclo termico:

Temperatura	Tempo	Numero di cicli
94 °C	2 minuti	1
94 °C	20 secondi	35
55 °C	30 secondi	
70 °C	30 secondi	
70 °C	5 minuti	1

Tabella 17: Ciclo termico impiegato per l'identificazione di B1 e B3.

La corsa elettroforetica è stata svolta come riportato nel paragrafo 3.4.2.3 della sezione di Materiali e Metodi.

✓ **Sequenziamento *Sanger***

Questo tipo di analisi è stata condotta presso *BMR genomics* per l'analisi *Multilocus Sequence Typing*. La reazione di sequenziamento è un'applicazione della metodica classica di PCR modificata: per esempio, nella miscela di reazione è presente un solo *primer* e vengono utilizzati nucleotidi di due diverse tipologie (nucleotidi normali e dideossinucleotidi marcati). Il principio su cui si basa tale metodica di sequenziamento prende il nome del suo ideatore (*Sanger*).

La *taq* polimerasi catalizza l'attacco dei nucleotidi modificati e non, a partire dal *primer*; l'incorporazione dell'una o dell'altra tipologia di nucleotidi è casuale. L'incorporazione di dideossinucleotidi non permette la prosecuzione della catena nucleotidica poiché questi presentano un atomo di idrogeno in posizione 3, invece che un gruppo ossidrilico, come si riscontra nei nucleotidi normali. La reazione di PCR così condotta porta alla formazione di un numero elevato di prodotti, differenziati gli uni dagli altri per lunghezza.

✓ **Analisi molecolare filogenetica**

L'analisi dell'*output* del sequenziatore è stata condotta con il programma FinchTV versione 1.4.0 (Geospiza, Inc), che permette di visualizzare i *file* contenenti i cromatogrammi. Essi presentano una serie di picchi, ciascuno rappresentato dalla fluorescenza rilevata dal sequenziatore durante l'analisi dei campioni; inoltre hanno quattro colori diversi, corrispondenti ai 4 diversi deossinucleotidi. Tale programma ha permesso anche l'ottenimento delle sequenze in formato FASTA, necessarie per le analisi successive. Confermato l'allele per ogni campione di ciascuno dei 7 frammenti genici per

l'analisi MLST, essi sono stati tagliati in frammenti di dimensioni uguali, corrispondenti alla medesima regione genica e riportati in formato FASTA. Le sequenze di ogni gene sono state unite in un'unica sequenza, nel giusto ordine genico (*glpF*, *gmK*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA* e *tpi*), ciascuno in direzione 5'→3' ed in-frame in modo da rappresentare un'unica sequenza codificante lunga 2.829 nt, chiamata concatenamero. L'analisi filogenetica è stata condotta con il *software* MEGA 5.0 utilizzando l'algoritmo di *Neighbor-Joining* con un supporto di *bootstrap* di 1000. Il concatenamero B1 è stato allineato con il concatenamero del ST985 scaricato dal MLST database di *Bacillus cereus*, e con i concatenameri ottenuti dai genomi completi di ceppi appartenenti al *Bacillus cereus* group.

Descrizione ceppo	Accession number
<i>B. mycooides</i> ATCC 6462	NZ CP009692.1
<i>B. weihenstephanensis</i> WSBC 10204	NZ CP009746.1
<i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4	NC 010184.1
<i>B. toyonensis</i> BCT-7112	NC 022781.1
<i>B. thuringiensis</i> MC28	NC 018693.1
<i>B. cereus</i> FM1	NZ CP009369.1
<i>B. thuringiensis</i> BGSC 4AA1	NZ CP010577.1
<i>B. thuringiensis</i> HD 1002	NZ CP009351.1
<i>B. cereus</i> G9241	NZ CP009590.1
<i>B. cereus</i> 03BB87	NZ CP009941.1
<i>B. thuringiensis</i> HD-789	NC 018508.1
<i>B. thuringiensis</i> HD-771	NC 018500.1
<i>B. cereus</i> G9842	NC 011772.1
<i>B. anthracis</i> Han	NZ CP008854.1
<i>B. thuringiensis</i> HD 1	NZ CP010005.1
<i>B. thuringiensis</i> HD1011	NZ CP009335.1

Tabella 18: Lista dei genomi completi di ceppi appartenenti al *Bacillus cereus* group utilizzati per l'analisi filogenetica.

3.4.2.2.3 Screening per la ricerca dei geni codificanti le principali tossine in B1 e B3

Confermata l'appartenenza dei nostri campioni al *Bacillus cereus* group, l'analisi è proseguita per determinare mediante l'analisi per PCR, la presenza dei geni codificanti le tossine note. Le porzioni dei geni codificanti per le tossine diarroiche *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *entFM*, *bceT* e la sequenza specifica per la tossina emetica (*em*) sono stati amplificati utilizzando il set di *primer* riportati da Yang *et al.*, 2005 e utilizzando come controllo interno le regioni dal 16S al 23S rRNA che delimitano la *Internal Transcribed Sequence* (ITS).

Primer	Gene	Tm (°C)	Lunghezza frammenti (bp)	Sequenza (5' →3')
HA-F1	<i>hblA</i>	58.1	237	ATT ATT ACA GGG GAT GGA GAA ACT T
HA-R		58.9		TGA TCC TAA TAC TTC TTC TAG ACG CTT
HC-F1	<i>hblC</i>	61.6	386	CCT ATC AAT ACT CTC GCA ACA CCA AT
HC-R1		58.9		TTT TCT TGA TTC GTC ATA GCC ATT TCT
HD-F1	<i>hblD</i>	62.7	430	AGA TGC TAC AAG ACT TCA AAG GGA AAC TAT
HD-R1		60.4		TGA TTA GCA CGA TCT GCT TTC ATA CTT
NA-F1	<i>nheA</i>	60.1	475	ATT ACA GGG TTA TTG GTT ACA GCA GT
NA-R1		63.7		AAT CTT GCT CCA TAC TCT CTT GGA TGC T
NB-F1	<i>nheB</i>	63.5	328	GTG CAG CAG CTG TAG GCG GT
NB-R1		58.5		ATG TTT TTC CAG CTA TCT TTC GCA AT
NC-F1	<i>nheC</i>	61.0	557	GCG GAT ATT GTA AAG AAT CAA AAT GAG GT
NC-R1		61.0		TTT CCA GCT ATC TTT CGC TGT ATG TAA AT
FM-F2	<i>entFM</i>	59.7	290	CAA AGA CTT CGT AAC AAA AGG TGG
FM-R2		58.1		TGT TTA CTC CGC CTT TTA CAA ACT
BCET-F1	<i>bceT</i>	64.4	701	AGC TTG GAG CGG AGC AGA CTA TGT
BCET-R1		59.3		GTA TTT CTT TCC CGC TTG CCT TTT
EM-1R	<i>em</i>	69.5	635	GTA TTT CTT TCC CGC TTG CCT TTT
EM-1R		62.9		AGC TTG GAG CGG AGC AGA CTA TGT
ITS-F1	<i>its</i>	61.6	185	AAT TTG TAT GGG CCT ATA GCT CAG CT
ITS-R1		58.5		TTT AAA ATA GCT TTT TGG TGG AGC CT

Tabella 19: Sequenze dei *primer* utilizzati per la ricerca delle tossine di B1 e B3.

In ogni campione il volume della miscela di reazione era pari a 20 µl. I reagenti utilizzati sono riportati nella tabella sottostante (Tabella 20), con le relative concentrazioni finali.

Reagenti	Concentrazione reagenti	Quantità (µl)
Buffer di reazione 5X	1X	4
MgCl2 25mM	2.5 mM	2
dNTPs 25 µM ognuno	0.25 µM	0.2
Primer forward 10 µM	0.25 µM	0.5
Primer reverse 10 µM	0.25 µM	0.5
Taq Polimerasi 5U/µl	1U	0.2
DNA 2 ng/µl	10 ng	5
H2O BDH	Fino a 20 µl	7.6

Tabella 20: Composizione della miscela di reazione per singolo campione, con le relative concentrazioni e le quantità, espresse in µl, per un volume finale di 20 µl.

I campioni sono stati amplificati nel termociclatore con il seguente ciclo termico:

Temperatura	Tempo	Numero di cicli
94 °C	2 minuti	1
94 °C	30 secondi	35
56 °C	30 secondi	
72 °C	45 secondi	
72 °C	5 minuti	1

Tabella 21: Ciclo termico impiegato per la ricerca delle tossine di B1 e B3.

3.4.2.3 Elettroforesi in gel di agarosio

I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio per valutare l'avvenuta amplificazione delle porzioni genomiche.

L'elettroforesi è una metodica che si basa sulla migrazione degli acidi nucleici in una matrice più o meno complessa, generalmente di agarosio o acrilamide, sotto l'impulso di un campo elettrico. L'acido nucleico, infatti, essendo una molecola dalla carica netta negativa per l'elevata presenza di gruppi fosfato, se sottoposto a una differenza di potenziale, migra verso il catodo.

Nel nostro caso è stato utilizzato un gel di agarosio all'1,8 %. La scelta delle concentrazioni dell'agarosio è dovuta alle dimensioni delle porzioni geniche che si ipotizza siano presenti nel campione stesso, in modo che la separazione delle stesse sia adeguata. Il gel è stato preparato usando un tampone a bassa forza ionica, quale il TAE, usato anche come tampone di corsa elettroforetica ed è composto da Tris 2 M, acido acetico glaciale 1 M e EDTA 0,1 M.

La visualizzazione del DNA nel gel è stata permessa grazie all'utilizzo di *SYBR[®] Safe (Invitrogen)*, ovvero un intercalante degli acidi nucleici, usato in alternativa all'Etidio Bromuro, composto tossico perché mutageno.

La preparazione del gel è stata effettuata sciogliendo l'agarosio (*Gelliphore, Euroclone*) in TAE 1X alla temperatura di ebollizione, aggiungendo *SYBR[®] Safe (Invitrogen)* a una concentrazione di 0,1 mg/ml e introducendo il tutto nella cameretta di corsa. Avvenuta la solidificazione, il gel è stato introdotto nella vaschetta per elettroforesi e ricoperto con TAE 1X. Il caricamento dei campioni è stato effettuato unendo 5 µl di prodotto di PCR e 5 µl di *Loading Buffer 2X Green GoTaq[®] Flexi Buffer* (Promega). Nei pozzetti alle estremità del gel è, inoltre, caricato 2 µl di un marcatore di pesi molecolari da 100 pb (100 pb DNA *Ladder, BIOLABS*).

Il gel è stato poi fatto correre a 100 V, 400 mA e 100 W per circa 20 minuti, dopodiché la corsa elettroforetica è stata visualizzata con lo strumento *Gel Doc XRTM (Biorad)*, che permette

l'esposizione del gel d'agarosio alla radiazione ultravioletta e di effettuare la fotografia dell'immagine così ottenuta.

4. RISULTATI

4.1 Analisi microbiologica e valutazione del pH dei campioni

Per valutare la qualità della Ricotta industriale durante la *shelf-life* analisi microbiologiche e chimiche sono state condotte come schematizzato nella Tabella 1 dei Materiali e metodi.

Per le analisi microbiologiche è stata rilevata la carica batterica mesofila, le spore aerobie totali e *Pseudomonas* utilizzando i terreni descritti nella Tabella 2 dei Materiali e Metodi.

Dal grafico si può notare che la carica batterica mesofila (CBM), osservata in *Milk PCA*, parte già a valori alti di circa 10^4 CFU/g e si innalza ulteriormente fino a 10^7 - 10^8 CFU/g entro i primi 14 giorni di conservazione. La carica di spore aerobie (CSA), osservata in *Milk PCA* più amido, evidenzia il suo picco maggiore entro i primi 20 giorni per poi calare nel periodo successivo e rialzarsi successivamente pur rimanendo tra i 10^3 - 10^4 CFU/g.

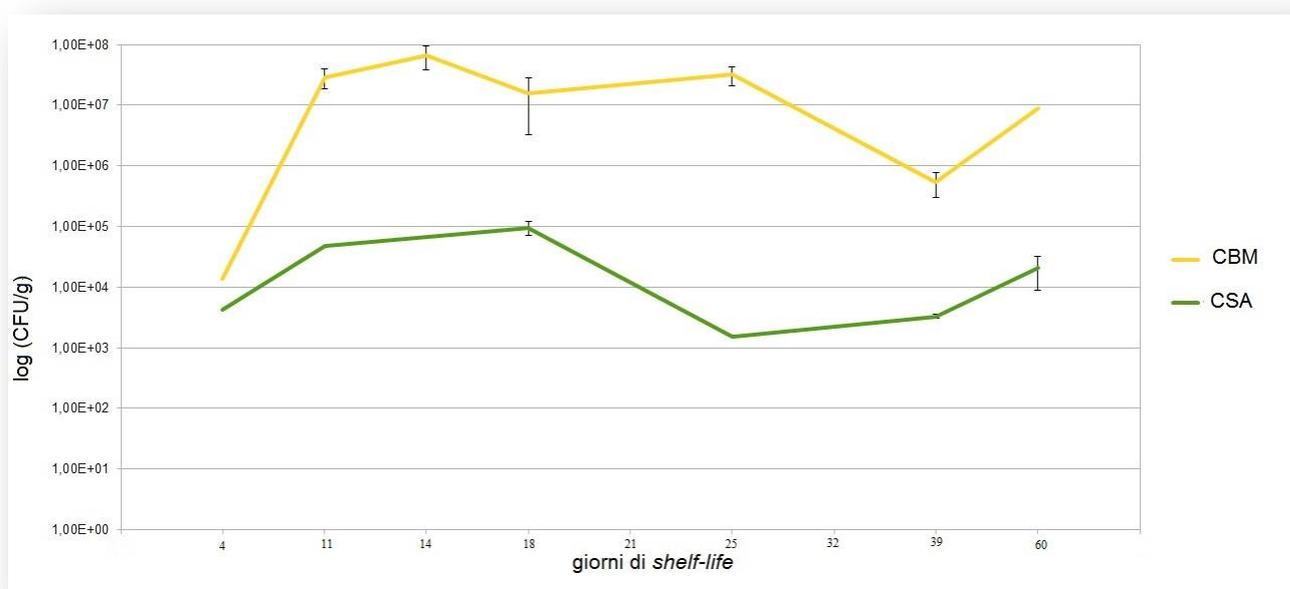


Grafico 1: Rappresenta la variazione della carica batterica mesofila e della carica delle spore aerobie, espressa in CFU/g, durante la *shelf-life* delle Ricotte. Vengono riportate le relative deviazioni standard.

L'assenza di *Pseudomonas fluorescens* è stata verificata su terreno CFC al 25esimo e 60esimo giorno di *shelf-life*.

I valori di pH misurati per ogni campione di Ricotta sono rappresentati come valore medio dei tre campioni analizzati per ogni tempo. La Ricotta ha un pH iniziale di 6.3-6.4 (come ci si attende per questi prodotti caseari, Mucchetti and Neviani., 2006), successivamente tra l'11esimo ed il 14esimo giorno si è verificato un brusco calo, per poi scendere ancora fino a stabilizzarsi a valori di 5.5. Il

trend di abbassamento del pH rispecchia l'andamento visto per la carica batterica mesofila. Al termine dei monitoraggi, i campioni hanno presentato la maggiore variabilità di pH. Questo è da associare al fatto che tra le Ricotte analizzate alcune presentavano gravi difetti organolettici caratterizzate da pH molto acidi.

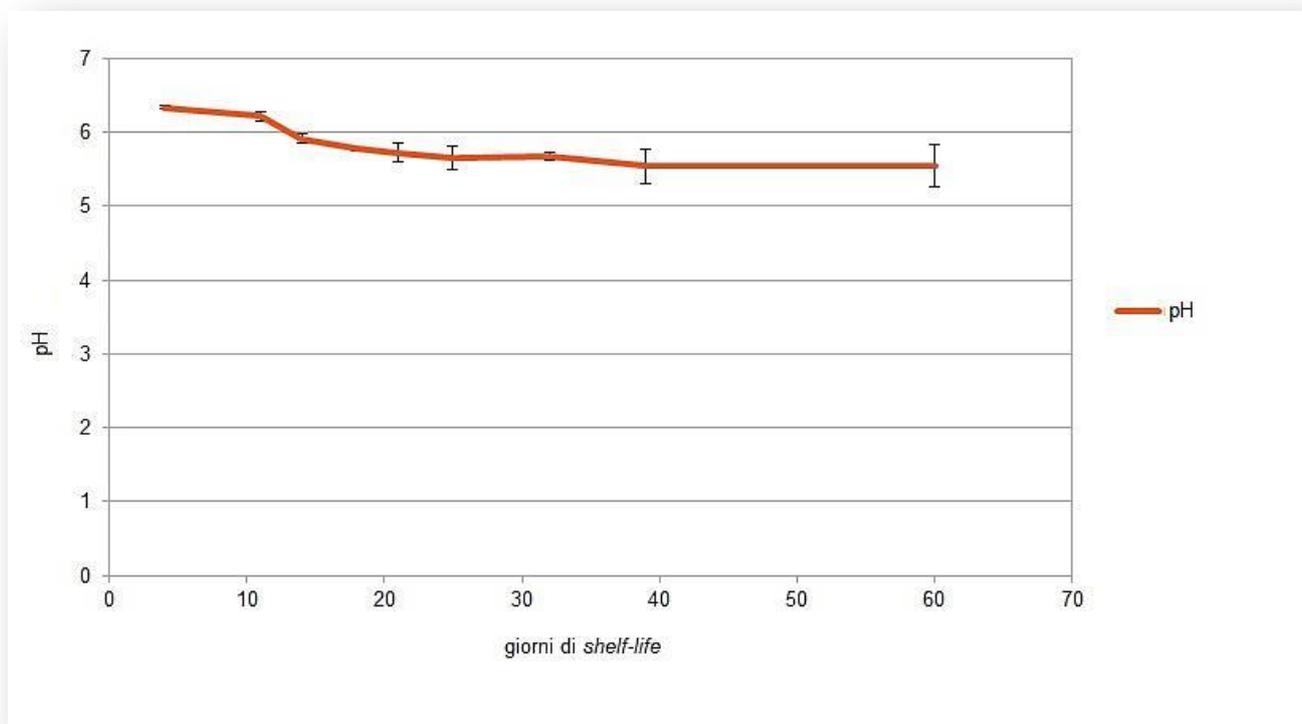


Grafico 2: Rappresenta la variazione di pH durante la *shelf-life* delle Ricotte. Vengono riportate le relative deviazioni standard.

4.2 Comunità microbica durante la *shelf-life*

Per avere una descrizione dettagliata della comunità microbica si è deciso di procedere con il sequenziamento mediante *Next Generation Sequencing* di librerie dell'amplicone 16S rRNA.

Questo metodo determina in modo robusto la diversità e l'abbondanza delle comunità microbiche in forma sia qualitativa che quantitativa. L'RNA è stato estratto dai campioni di Ricotta e retrotrascritto come descritto nei Materiali e Metodi, paragrafo 3.4.1.2.

Il cDNA, ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA, è stato utilizzato come stampo per la costruzione della libreria con il fine di rappresentare la microflora vivente. L'analisi al *MiSeq* ha prodotto 1.380.586 *reads* grezze, con ampliconi di lunghezza media di 466 bp compresi tra le regioni V3 e V4 del gene 16S rRNA.

I risultati dell'analisi Bioinformatica con il programma Qiime ci ha fornito diverse informazioni. L'Unità Tassonomica Operativa (OTU) o taxon è un raggruppamento di organismi reali,

distinguibili morfologicamente e geneticamente da altri e riconoscibili come unità sistematica, posizionata all'interno della struttura gerarchica della classificazione scientifica. Ciascuna OTU corrisponderà ad una specifica sequenza della porzione del gene 16S rRNA contenuta nell'amplicone, che il programma assegna sulla base di un confronto con un database di riferimento. Vengono quindi identificate le OTU presenti in ciascun campione e quantificate sulla base del numero di *reads* per OTU per campione. Inoltre il programma riunisce le OTU che definiscono la stessa tassonomia batterica fornendo quindi un valore percentuale corrispondente alla rappresentatività di quel gruppo batterico nella comunità totale.

Il programma fornisce inoltre dei dati riguardo la α -diversity (diversità all'interno di ciascun campione) e la β -diversity (diversità tra i campioni). Considerando le comunità di tutti i campioni, sono state rilevate 2.302 OTU, tenendo conto delle sole OTU con più di 5 *reads*. L'analisi della α -diversity dimostra che le OTU (definite qui *observed species*) non sono in numero uguale tra i campioni, infatti sono comprese tra un minimo di 400 e un massimo di 3.500 (Figura 6). Tuttavia il numero di *reads* ottenute anche per i campioni più scarsi (circa 9.000) può comunque essere considerato sufficiente per descrivere in modo approfondito la microflora di un alimento pastorizzato (Ercolini 2013).

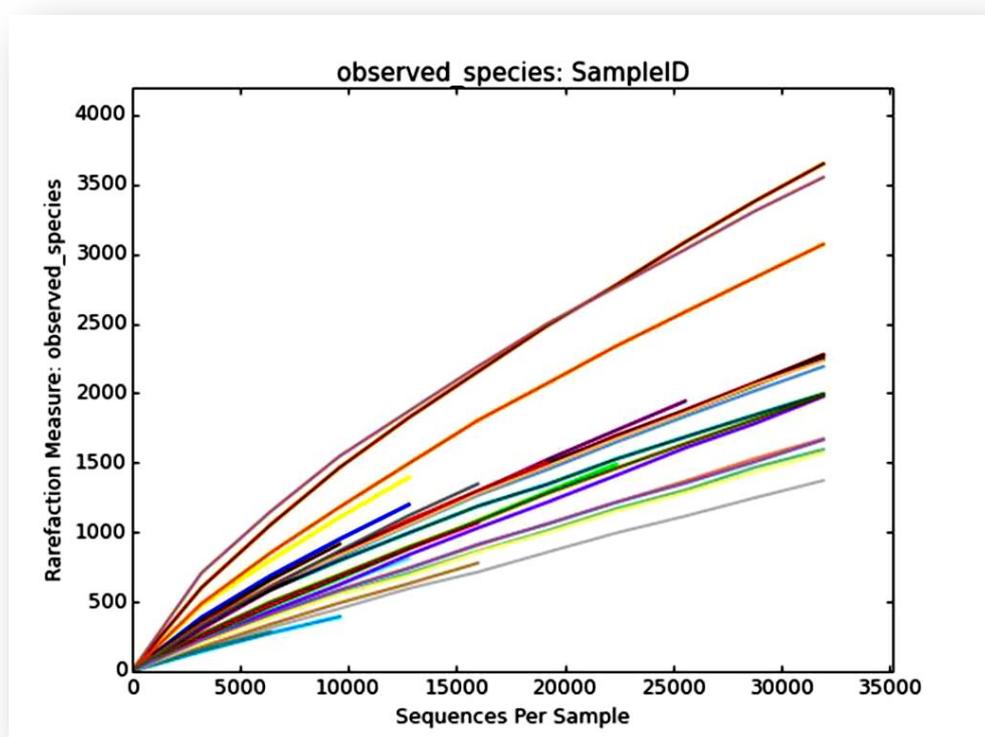


Figura 6: Curve di rarefazione.

Il campione 11_S3 (chiamato anche E6) ha dimostrato di essere rappresentato da un numero insolito di OTU e la sua comunità è risultata completamente diversa dalla microflora presente nei campioni 11_S1 e 11_S2 analizzati nello stesso tempo ed è stato quindi escluso dalle analisi. La comunità microbica del campione 14_S3 (chiamato anche E9), che presentavano una colorazione “Rosa”, è stata esclusa dalle analisi generali e verrà descritta più approfonditamente nei prossimi paragrafi.

Analizzando la composizione della comunità delle Ricotte risulta che oltre il 99 % della popolazione è rappresentato da quattro diversi *phyla* (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, e *Bacteroides*) tra cui predomina nettamente il phylum dei *Firmicutes* (>98 % in tutti i campioni).

Analizzando la diversità microbica assegnata con la tassonomia, il numero di OTU che definiscono il genere sono 2.028. Questo dimostra che, utilizzando la regione V3-V4 del gene 16S rRNA, la maggior parte delle OTU ottenute riescono a definire il genere (Mayo *et al.*, 2014) e che, la distribuzione dei generi potrebbe descrivere la popolazione microbica di questi campioni.

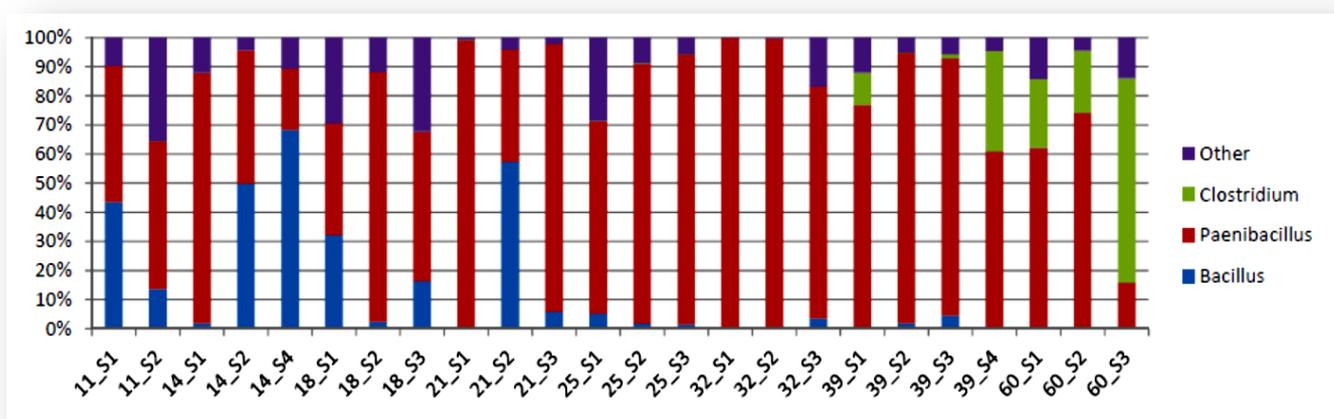


Figura 7: Distribuzione dei principali generi nei diversi campioni.

Queste OTU identificano per venti diversi generi di campioni, tuttavia come si vede in Figura 7, sono tre i generi predominanti: *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Clostridium*, che coprono più dell’80 % della microflora nella maggior parte dei campioni (esclusi cinque campioni in cui tre generi sono compresi tra il 60 % e il 80%).

L'identificazione a livello di specie è stata ottenuta da 117 OTU, identificando 18 specie diverse. La distribuzione delle specie conferma la maggiore biodiversità in *Firmicutes* con 5 specie di *Bacillus*, 5 di *Clostridium* e 2 di *Paenibacillus*.

4.3 Caratterizzazione molecolare di colonie “Rosa” isolate dal campione 14_S3

Il campione 14_S3 di Ricotta all’apertura presentava una colorazione “rosea”; difetto già riscontrato in passato all’interno del Caseificio “Elda”. Diversi terreni addizionali sono stati utilizzati per ottenere un’identificazione microbiologica dei batteri coinvolti nella produzione del pigmento, come descritto in Materiali e Metodi al punto “Isolamento delle colonie pigmentate”. Sulla base dei possibili microrganismi responsabili della colorazione “Rosa”, sono stati testati diversi terreni: per lieviti (Moliné *et al.*, 2012), *Lactobacilli* (Daly *et al.*, 2012), *Micrococcaceae* (Jagannadham *et al.*, 1996) e *Pseudomonas* (Downs e Harrison. 1974). Il risultato è stato negativo per tutti i terreni escludendo così questi *taxa* come i probabili responsabili. Colonie bianche recuperate in piastre TSA, dopo un mese di incubazione a 8° C diventavano “Rosa”, mentre nel terreno minimo (MBM) le colonie rimanevano bianche.



Foto 5: Colonie “Rosa” su TSA.

Due colonie “Rosa” (chiamate B1 e B3), cresciute in terreno liquido TSB, sono state utilizzate per inoculare due confezioni di Ricotta dimostrando la capacità di produrre il pigmento rosa dopo 14 giorni a 8 °C, come dimostrato per il campione di Ricotta 14_S3.

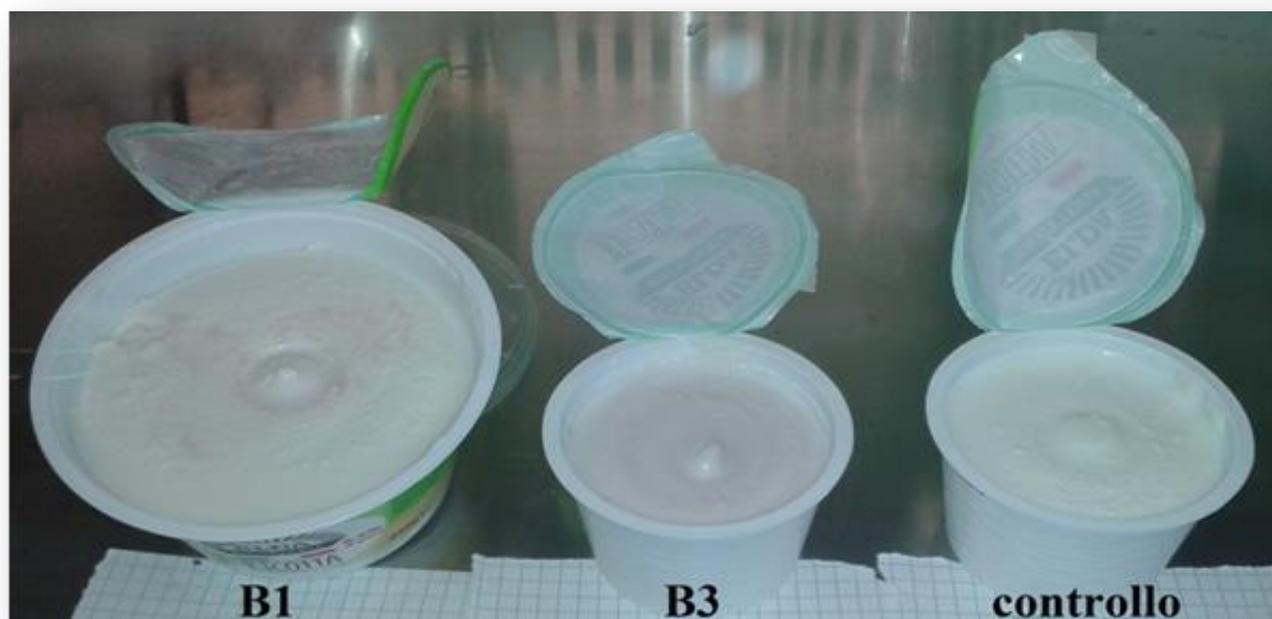


Foto 6: Prove di inoculo in Ricotte “Elda” commerciali.

4.4 Identificazione di specie dei ceppi isolati da Ricotta “Rosa”

Dalle colonie B1 e B3 è stato estratto il DNA come descritto nel paragrafo 3.4.2.1 di Materiali e Metodi, ed è stato sottoposto ad amplificazione con diversi *primer*. Per prima cosa è stata amplificata una porzione del gene 16S rRNA. Il sequenziamento della porzione del gene 16S rRNA delle colonie B1 e B3, ha dimostrato per entrambe un’identità del 99 % con i ceppi appartenenti al gruppo *Bacillus cereus*.

L’utilizzo dei *primer*, specifici per il gene *rpoB* di *Bacillus*, ha permesso di confermare il risultato ottenuto dal sequenziamento del 16S e di evidenziare la presenza di tale specie nei campioni di Ricotta “Rosa”. Dopo aver effettuato l’estrazione del DNA dalle colonie rivitalizzate in TSB, la qualità e la quantità dell’estratto è stata valutata tramite μ DROP ed è stato deciso di applicare ai campioni una diluizione di 1:100.

Nell’analisi è stato inserito come controllo positivo, un DNA estratto dal ceppo 26 già identificato come *Bacillus cereus* in un precedente studio (Cardazzo *et al.*, 2008).

Gli amplificati ottenuti sono stati sequenziati presso *BMR genomics*. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti nel database tramite il programma BLAST. Questa analisi ha permesso di identificare i due campioni B1 e B3 come *B. weihenstephanensis*, indicando così il loro probabile ruolo nel determinare la colorazione “Rosa”.

Per l’identificazione della specie e del ceppo è stata applicata la metodica MLST (Cardazzo *et al.*, 2008) e le sequenze sono state comparate con il *database* MLST di *Bacillus cereus* (<http://pubmlst.org/bcereus/>). Nell’analisi è stato inserito come controllo positivo, il campione 26.

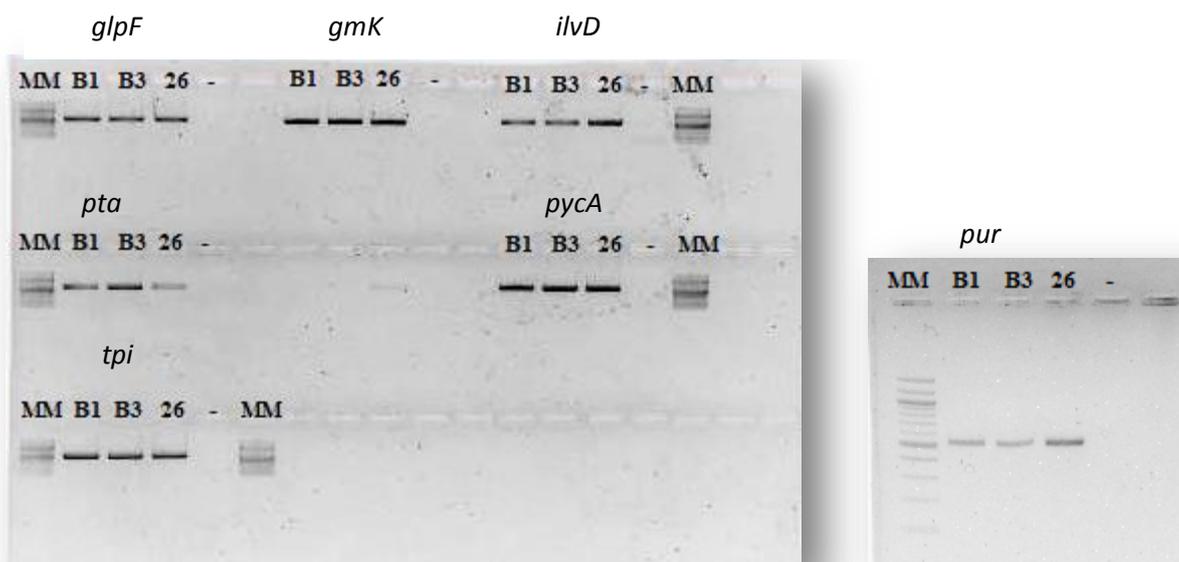


Foto 7 e 8: Risultato delle corsa elettroforetica della PCR condotta sui geni MLST per le due colonie B1 e B3 e sul controllo positivo indicato con numero 26; marcatore molecolare (MM) 100 pb.

La definizione del *Sequence Type* (ST) ha dimostrato una nuova combinazione allelica, identica per le due colonie B1 e B3, che è stata inviata al *database* ottenendo un nuovo ST 1008 (*glp* 84, *gmk* 10, *ilv* 22, *pta* 217, *pur* 57 *pyc* 22 *tpi* 11). Il più simile ST presente nel *database* MLST di *Bacillus cereus* al nostro ST 1008 era l'ST 985 (locus con una singola variante, *glp* 64).

✓ Analisi filogenetica ed identificazione di specie

L'analisi filogenetica, eseguita con il *software* MEGA 5.0, dei concatenamenti dell'ST 1008, ST 985 e di sedici genomi completi di ceppi appartenenti al *Bacillus cereus* group riportati in Tabella 18 di Materiali e Metodi, ha permesso di ottenere il seguente albero filogenetico.

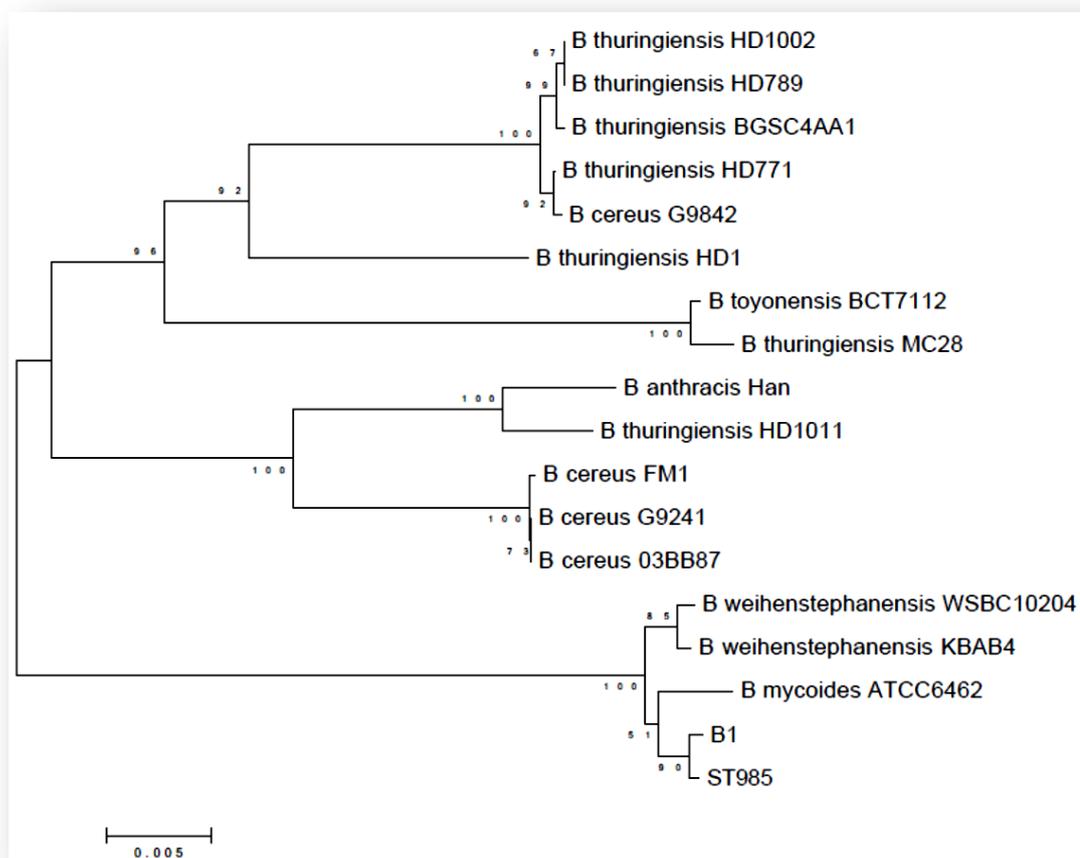


Figura 8: Albero di *Neighbor-joining* con schema MLST di *Bacillus cereus* di sequenze concatenate di B1, ST985 e genoma completo di ceppi del gruppo *Bacillus cereus*.

L'albero è in grado di discriminare i ceppi in tre gruppi: nel primo gruppo sono localizzati i ceppi di *B. thuringiensis* con un supporto di *bootstrap* dell'89 %, nel secondo gruppo sono localizzati i ceppi di *B. cereus* e, infine, nel terzo gruppo i ceppi di *B. weihenstephanensis*/*B. mycooides* entrambi questi gruppi supportati da un *bootstrap* del 100 %. Come ci aspettavamo il ceppo B1/B3 si localizza all'interno del terzo gruppo, appartiene a *B. mycooides* specie *B. weihenstephanensis*, in accordo con Páčová *et al.*, 2003 ed è filogeneticamente vicino ad ST 985.

✓ Comunità microbica del campione 14_S3

L'analisi della comunità microbica del campione 14_S3 che presentava colorazione "rosea" ha permesso di evidenziare che il 65,5 % della comunità è composto da un OTU identificata come appartenente alla famiglia *Bacillaceae*, il genere non è stato definito. La sequenza corrispondente, *denovo40521*, è stata estratta dal file "*pynast_aligned_seqs*" prodotto da *Qiime* e l'analisi *Blast* contro *Nucleotide Genbank* ha identificato il gruppo *Bacillus cereus*, dimostrando che, la microflora predominante in questo campione, è un ceppo appartenente al gruppo *B. cereus*. Inoltre la sequenza *denovo40521* risulta identica alla sequenza del gene 16S rRNA da noi precedentemente eseguita sul ceppo isolato B1 confermando che il ceppo B1 è il principale colonizzatore della ricotta 14_S3 ed è la causa della colorazione anomala.

Comunità microbiche della Ricotta

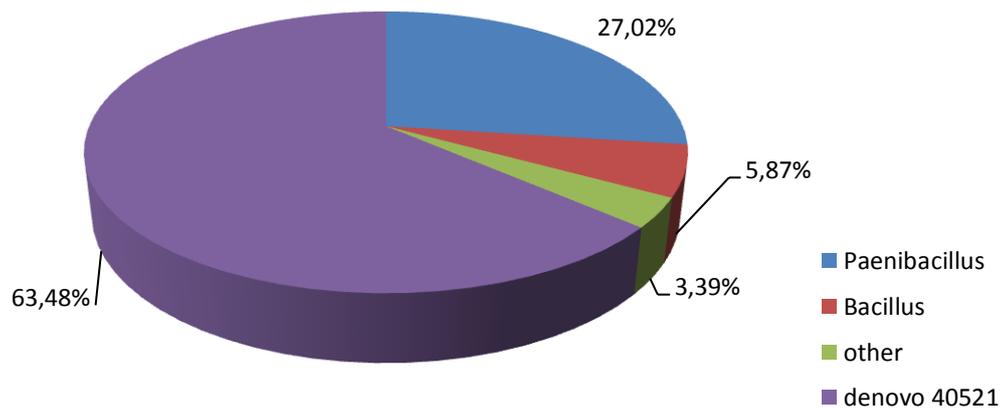


Grafico 3: Rappresentazione delle comunità microbiche della Ricotta.

Per valutare il potenziale rischio sanitario associato all'alterazione "Rosa", le colonie B1 e B3 sono state analizzate per la presenza dei geni tossigeni e il risultato è rappresentato in tabella 22. Nell'analisi sono stati inseriti dei controlli positivi per le diverse tossine.

	HA	HC	HD	NA	NB	NC	FM	BCET	EM	ITS
B1	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+
B3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+

Tabella 22: profilo genico delle tossine ottenuto con PCR dei ceppi B1 B3.

I ceppi sono risultati positivi a diversi geni delle tossine (geni *Nhe* e *entFM*), ma negativi per la tossina emetica come già riportato nei ceppi identificati come *B. weihenstephanesis* (Thorsen *et al.*, 2006; Stenfors Andersen *et al.*, 2008).

5. DICUSSIONE

5.1 Analisi della carica batterica e del pH delle Ricotte

La Ricotta è un latticino la cui tecnica di produzione non prevede l'uso di starter e la cui microflora è quindi la somma di quella resistente al trattamento termico impiegato per denaturare le proteine e di quella eventuale di post-contaminazione. Le caratteristiche microbiologiche delle Ricotte variano perciò in funzione delle tecnologie produttive e dalle condizioni igienico-sanitarie ambientali.

In questo studio l'analisi microbiologica di una Ricotta di produzione industriale, ha dimostrato che i microrganismi aerobi mesofili (CBM) raggiungono il loro picco massimo entro i primi 14 giorni, raggiungendo concentrazioni molto elevate di 10^7 - 10^8 CFU/g. Seppur di per sé non correlabile direttamente alla sicurezza microbiologica dell'alimento, è pur sempre un indicatore di contaminazione globale della matrice alimentare analizzata. Valori così elevati di concentrazione in parte derivano dalle cariche batteriche presenti nella materia prima (siero di latte e panna) al momento del suo impiego per la produzione della Ricotta e in parte riconducibili a contaminazioni a valle delle filiera produttiva.

Diversi studi condotti su diverse tipologie di latte mostrano cariche di batteri mesofili comprese tra 10^2 e 10^7 CFU/ml principalmente di batteri lattici, inclusi lattococchi e lactobacilli, così come *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* che possono resistere in parte ai trattamenti termici (Quigley *et al.*, 2012). L'incremento che si verifica nei microrganismi aerobi mesofili, nei primi 14 giorni, può essere associato allo sviluppo di una microflora termoresistente (batteri termodurici e spore) che sopravvive al trattamento termico durante le fasi di produzione e di pastorizzazione (Buehner *et al.*, 2014). Le spore aerobie risultano sempre presenti nei 60 giorni di *shelf-life*. Le spore sono molto resistenti al calore, ai disinfettanti e alle condizioni estreme. Quando vengono attivate e/o messe in un ambiente favorevole, le spore possono germinare e crescere ancora come, batteri vegetativi attivi. Vi sono indicazioni che le pastorizzazioni possono attivare la germinazione delle spore e dunque comportare una più rapida crescita di ceppi psicrotrofi, portando ad un prodotto con ridotta *shelf-life* (Dairy Foods Science Notes. 2010). Anche nel latte sterilizzato commerciale è stato segnalato il deterioramento causato dalla specie *Bacillus*, anche se, in questo caso il fenomeno è in gran parte causato da enzimi proteolitici termostabili e lipolitici o dalla ricontaminazione del latte sterilizzato durante il confezionamento. Tuttavia, è stato possibile dimostrare che diverse specie di *Bacillus*, isolate da latte sono in grado di produrre spore altamente resistenti al calore in grado così di sopravvivere ai processi industriali di sterilizzazione di tipo *UltraHigh Temperature* (UHT) (Coorevits *et al.*, 2008). È stato dimostrato che, la presenza di *Bacillus* nel latte crudo subisce dei

cambiamenti in base alla stagionalità, per esempio *Bacillus cereus* presenta un elevato numero di spore nel latte durante l'estate rispetto all'inverno. Il suolo rappresenta la fonte principale di spore di *B. cereus* e le vacche allevate all'aperto ne sono maggiormente a contatto rispetto a quelle in stabulazione fissa. Anche gli alimenti, come insilati e mangime concentrato, è stato dimostrato contenere un elevato livello di spore aerobiche e Giffel *et al.*, nel 2002 hanno dimostrato come l'insilato è considerato una fonte significativa di contaminazione del latte crudo con spore. Inoltre, poiché i mangimi concentrati spesso contengono rifiuti di lavorazione di prodotti agricoli esotici a buon mercato, esso rappresenta una potenziale fonte di nuovi, sconosciuti batteri sporigeni, con la possibilità di introdurre nuove caratteristiche di resistenza, deterioramento o rischi per la salute umana (Coorevits *et al.*, 2008). Il gruppo *Pseudomonas fluorescens* comprende diverse specie strettamente imparentate, che sono anch'esse coinvolte nella contaminazione e nel deterioramento degli alimenti. A causa delle loro caratteristiche psicrotrofe e mesofile, possono replicarsi a temperature di refrigerazione anche se, sono facilmente eliminabili attraverso i trattamenti termici. Tuttavia lunghi periodi di *shelf-life* possono facilmente portare ad un aumento della concentrazione di *Pseudomonas* negli alimenti (Andreani *et al.*, 2014). Per questo motivo, anche nel nostro studio abbiamo inserito due controlli per *Pseudomonas* al 25esimo e 60esimo giorno, risultando comunque entrambi negativi.

La Ricotta ha un pH iniziale di 6.3-6.4, (come ci si attende per questi prodotti caseari, Mucchetti and Neviani, 2006), successivamente tra l'11esimo ed il 14esimo giorno si è verificato un brusco calo, per poi scendere ancora fino a stabilizzarsi a valori di 5.5. Il *trend* di abbassamento del pH rispecchia l'andamento visto per la carica batterica mesofila in quanto, *B. cereus* è in grado di resistere negli alimenti acidificati, durante la lavorazione e la conservazione alimentare. La capacità di resistere alle condizioni di acidità viene confermata dall'osservazione che, alcuni componenti del *Bacillus cereus group* sono in grado sopravvivere alla barriera gastrica dell'intestino umano causandone intossicazione alimentare (Mols *et al.*, 2010).

5.2 Valutazione delle comunità microbiche durante la *shelf-life*

La comunità microbica presente nella Ricotta durante la *shelf-life*, è stata studiata grazie al sequenziamento mediante *Next Generation Sequencing* di librerie dell'amplicone 16S rRNA. Nella comunità predomina nettamente il phylum dei *Firmicutes*, come previsto nei prodotti latticini (Quigley *et al.*, 2013). I batteri sporigeni costituiscono la microflora predominante in tutti i campioni di Ricotta essendo prodotta dal lungo processo di riscaldamento e pastorizzazione del latte (Buehner *et al.*, 2014). Questi processi tecnologici inattivano la maggior parte delle forme vegetative, ma sono inefficaci contro le spore e, al contrario, possono contribuire alla loro germinazione (Setlow. 2014). Fino al 21esimo giorno, la microflora dimostra una certa variabilità

nella distribuzione dei generi, questo potrebbe essere dovuto al fatto che in ogni singola confezione è presente un genere predominante. La peculiare presenza del genere *Bacillus* durante la prima parte della *shelf-life* e la successiva sostituzione con il genere *Paenibacillus* era già stata osservata in latte (Switt *et al.*, 2014) e potrebbe essere una conseguenza della maggiore adattabilità del genere *Paenibacillus* alle condizioni di refrigerazione e all'abbassamento del pH. La presenza dei *Clostridi* si verifica solo nella tarda *shelf-life*, in genere essi sono presenti a livelli molto bassi a causa delle condizioni aerobie o microaerofile dettate dalle condizioni di confezionamento delle Ricotte. Infatti quello che si può vedere nei campioni analizzati a 60 giorni di *shelf-life* è che la popolazione microbica è prevalentemente costituita da *Clostridi*. La loro presenza in modo così marcato sarebbe dovuto al conseguente consumo di ossigeno da parte della microflora aerobia, in particolare *Bacillus* e *Paenibacillus*. Di conseguenza lo sviluppo dei *Clostridi* potrebbe essere influenzato dalla presenza di una microflora specifica.

L'utilizzo della regione V3-V4 del gene 16S rRNA, ha permesso di definire il genere per la maggior parte delle OTU, mentre per quanto riguarda il livello di specie, sono molto poche (circa 70) e quindi poco rappresentative. Questo era atteso dal sequenziamento delle brevi sequenze V3-V4 (Mizrahi *et al.*, 2014).

5.3 Identificazione di *B.cereus* isolato da Ricotte “Rosa”

Casi di prodotti lattiero caseari che presentano alterazioni cromatiche sono ormai molto diffusi. Basti pensare al caso delle “mozzarelle blu” dove il responsabile della produzione del pigmento è *P. fluorescens*. Anche in altri casi i consumatori, al momento dell'apertura della confezione integra e nel rispetto della data di scadenza, si trovavano di fronte a prodotti che presentavano macchie colorate. Questo è il caso riscontrato in fiocchi di latte *Cottage Cheese* di marca Linessa i quali presentavano piccole macchie rosse. L'azienda dopo aver ritirato le confezioni, imputa la presenza di tali macchie al lievito *Rhodotorula*, innocuo per la salute. Anche se innocuo per la salute, questo caso rileva la presenza di problemi di contaminazione della linea di produzione (IlFattoAlimentare, 8 settembre 2014). Anche in altri casi è stata verificata la presenza di colorazione rosa salmone o pois su diversi prodotti come: mozzarella, Ricotta, un formaggio spalmabile e uno a pasta filata per pizza e tre primosale acquistati in negozi nelle province di Torino, Vercelli e La Spezia. A seguito delle analisi condotte è stato dichiarato che tali prodotti erano esenti da salmonella o batteri patogeni potenzialmente a rischio per l'uomo. All'interno di questi prodotti, sono stati invece trovati lieviti pigmentati in quantità elevate, della specie *Sporobolomyces roseus*, già identificati in passato come responsabili dell'arrossamento di yogurt. Anche in questo caso si tratta di microrganismi innocui per la salute, anche se bisogna considerare il fatto che un alimento alterato permette la crescita sia di microrganismi innocui, come i lieviti, ma anche quella di agenti patogeni.

Anche durante il nostro studio abbiamo rilevato la presenza, in una confezione di Ricotta, di una colorazione “rosea”. A seguito dei casi già riscontrati si è proceduto alla ricerca dei microrganismi responsabili attraverso l’uso di diversi terreni: per lieviti (Moliné *et al.*, 2012), *Lactobacilli* (Daly *et al.*, 2012), *Micrococcaceae* (Jagannadham *et al.*, 1996) e *Pseudomonas* (Downs e Harrison, 1974); ma il risultato che si è ottenuto era negativo per tutti i terreni escludendo così questi taxa come i probabili responsabili. Alcune colonie mantenute su terreno TSA (*Tryptic Soy Agar*) dopo un mese di incubazione a 8 °C davano una colorazione “Rosa”, due di queste colonie (B1 e B3) sono state fatte crescere in terreno liquido TSB e utilizzate per inoculare due Ricotte “Elda” commerciali, dimostrando la capacità di ripristinare la colorazione rosa dopo una conservazione a 8 °C per 14 giorni. A seguito del sequenziamento della porzione del gene 16S rRNA delle due colonie è stato possibile dimostrare per entrambe un’identità del 99 % con i ceppi appartenenti al gruppo *Bacillus cereus*.

L’analisi della comunità microbica di questo campione ha dimostrato che la microflora predominante è un ceppo appartenente al gruppo *Bacillus cereus* ed è il responsabile della colorazione “Rosa”. È interessante notare che questa OTU è predominante solo in questo campione sul totale di 26 Ricotte analizzate. La chiave distintiva di *B. weihenstephanensis* è la sua capacità di crescere sotto i 7 °C o, dal punto di vista della sicurezza alimentare, di crescere e produrre tossine potenzialmente in un ambiente refrigerato (Stelder *et al.*, 2015).

Confermata l’appartenenza dei nostri campioni al *Bacillus cereus* group, era di interesse definire con precisione il ceppo e il profilo delle tossine. La presenza dei tre rispettivi geni *Nhe* suggerisce che questa tossina è presente nella forma di massima virulenza (Forghani *et al.*, 2014). Mentre, come dimostrato da Tran *et al.*, 2010 nell’insetto *Galleria mellonella*, la tossina EntFM ha proprietà che possono agevolare il processo di infezione. Anche se non con la massima virulenza, la tossina viene comunque prodotta in presenza delle componenti geniche *HA* e *HC*. L’identificazione di *B. weihenstephanensis* contenente diversi geni per le tossine è un’indicazione che la colorazione rosa è un’alterazione che può anche causare problemi sanitari al consumatore.

6. CONCLUSIONI

Lo studio della comunità microbica delle Ricotte durante la *shelf-life* ha permesso di dimostrare come in questo alimento è presente un'abbondante popolazione di batteri sporigeni i quali, sono responsabili del deterioramento del prodotto. Il deterioramento che essi provocano è legato ad un'acidificazione della Ricotta e in alcuni casi anche alla comparsa di una colorazione "Rosa". La presenza di questa flora sporigena è da correlare alla presenza di tali microrganismi direttamente alle materie prime, in particolare al siero. All'interno della comunità microbica di Ricotta si è riscontrata la presenza di ceppi appartenenti al *Bacillus cereus group*. Questo risulta di particolare interesse in quanto questi batteri possono essere patogeni ed inoltre riescono, mediante la produzione di spore a sopravvivere alla pastorizzazione e talvolta anche alla sterilizzazione. Questo fa sì che si possano ritrovare successivamente nel prodotto finito. Quindi, una strategia possibile adottabile dal caseificio per poter allungare la *shelf-life* della Ricotta sarebbe quella di approvvigionarsi di siero con adeguati *standard* qualitativi. Le tecnologie ad oggi utilizzate per far fronte a queste problematiche è di trattare il siero di latte attraverso la microfiltrazione e la bacto-fugazione le quali permettono l'eliminazione sia delle forme vegetative che delle spore.

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano inoltre come l'applicazione NGS sia in grado di descrivere in modo approfondito le comunità microbiche. Potrebbe quindi diventare in futuro uno strumento appropriato nella gestione dell'industria alimentare per migliorare la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari.

7. BIBLIOGRAFIA

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.

Andreani N.A., Martino M.E., Fasolato L., Carraro L., Montemurro F., Mioni R., Bordin P. and Cardazzo B., (2014) "Tracking the blue: a MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group". *Food Microbiol.*, 39:116-126.

Armougom F. and Didier R., (2009) "Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods". *Journal of Computer Science and Systems Biology*, 2009: 74-92.

Bartoszewicz M., Bideshi DK., Kraszewska A., Modzelewska E., Swiecicka I., (2009) "Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*". *J Appl. Microbiol.* 106:1967–1975.

Bhunias AK., (2008) "*Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*". In: Bhunia, A.K. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. West Lafayette, Springer. p.135-147.

Buehner K.P., Anand S., Djira G.D., Garcia A., (2014) "Prevalence of thermotolerant bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms". *J Dairy Sci.* 11:6777-6784.

Caporaso J.G., (2010) "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data". *Nature Methods*, 2010: 335-336.

Cardazzo B., E. Negrisol, L. Carraro, L. Alberghini, T. Patarnello, and V. Giaccone., (2008) "Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates". *Appl. Environ. Microbiol.* 74:850-860.

Castiaux V., E. N'Guessan, I. Swiecicka, L. Delbrassinne, K. Dierick & J. Mahillon, (2014) "Diversity of pulsed-field gel electrophoresis patterns of cereulide-producing isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis*". *FEMS Microbiol. Lett.* 353:124-131.

Christiansson A., (2011) "Pathogens in milk" Swedish Dairy Association, Lund, Sweden.

Coorevits An., V. De Jonghe, J. Vandroemme, R. Reekmans, J. Heyrman, W. Messens, P. De Vos, M. Heyndrickx, (2008) "Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in

- raw milk from organic and conventional dairy farms”. *Systematic and Applied Microbiology* 31:126–140.
- Coppola S., G. Blaiotta, D. Ercolini and G. Moschetti, (2003) “Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese”. *J. Appl. Microbiol.* 90: 414–20.
- Daffonchio D., Cherif A., and Borin S., (2000) “Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the *Bacillus cereus* group”. *Appl Environ Microbiol* 66: 5460–5468.
- Dairy Foods Science Notes, (2010) “Psychrotrophic spore-forming bacteria in raw and pasteurized milk”.
- Dairy Science & Technology, (2012) 92:439-453.
- Dale J.W. and Schantz M., (2004) “Dai geni ai genomi”. Milano, EdiSES, 143-159.
- Daly D., McSweeney P., Sheehan J., (2012) “Pink discolouration defect in commercial cheese: a review”.
- Downs J., Harrison D.E., (1974) “Studies on the production of pink pigment in *Pseudomonas extorquens* NCIB 9399 growing in continuous culture”. *J. Appl. Bacteriol.* 37:65-74.
- Dubravka S., Š. Zamberlin, T. Pogačić, (2012) “Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality”. *Mljekarstvo* 62 :77-95.
- Duc LH., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O. & Cutting S.M., (2004) “Characterization of *Bacillus* probiotics available for Human use”. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2161–2171.
- Ercolini D., (2004) “PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food”. *Journal of Microbiological Methods* 56: 297-314.
- Ercolini D., (2013) “High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology”. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 3148-3155.
- Forghani F., J. Kim and D. Oh., (2014) “Enterotoxigenic Profiling of Emetic Toxin- and Enterotoxin-Producing *Bacillus cereus*, Isolated from Food, Environmental, and Clinical Samples by Multiplex PCR”. *Journal of Food Science* Vol. 79, Nr. 11.

- Fuselli F., A. Deluca, E. A. Montepeloso, G. Ibba, F. Tidona, L. Longo, R. M. Marianella, (2014) “Detection of fraudulent addition of bovine whey in water buffalo ricotta cheese by isoelectric focusing”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10.1002/jsfa.7019.
- Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Ceragioli M., Beecher D.J., Senesi S., Wong A.C., (2007) “Swarming behavior of and hemolysin BL secretion by *Bacillus cereus*”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:4089–4093.
- Giffel M.C., T.A. Wagendorp, A. Herrewegh, F. Driehuis., (2002) “Bacterial spores in silage and raw milk”. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:625–630.
- Giraffa G., E. Neviani., (2001) “DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems”. *Int. J. Food Microbiol.* 67:19-34.
- Hansen B. M., P. E. Hiby, G. B. Jensen, N. B. Hendriksen, (2003) “The *Bacillus cereus* bceT enterotoxin sequence reappraised”. *FEMS Microbiology Letters* 223:21-24.
- Helgason E., Caugant D.A., Olsen I., and Kolstø A.B., (2000a) “Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections”. *J Clin Microbiol.*, 38:1615–1622.
- Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolstø A.B., (2004) “Multilocus Sequence Typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:191-201.
- Hoton F.M., Fornelos N., N’Guessan E., Hu X., Świącicka I., Dierick K., Jaaskelainen E., Salkinoja-Salonen M., Mahillon J., (2009) “Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* cereulide-producing strains”. *Environ Microbiol Rep* 1:177–183.
- Hough G., M. L. Puglieso, R. Sanchez, O. Mendes da Silva, (1999) “Sensory and Microbiological Shelf-life of a Commercial Ricotta Cheese”. *J. Dairy Sci.* 82:454-459.
- Jagannadham M.V., Chattopadhyay M.K., Shivaji S., (1996) “The major carotenoid pigment of a psychrotrophic *Micrococcus roseus* strain: fluorescence properties of the pigment and its binding to membranes”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:724-8.
- Justé A., Thomma B.P.H.J., Lievens B., (2008) “Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes”. *Food Microbiology* 25:745-761.
- Kotiranta A., Lounatmaa K., Haapasalo M., (2000) “Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections”. *Microbes Infect* 2:189-198.

- Larsen H.D. & Jørgensen K., (1997) “The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk”. *Int. J. Food Microbiol.*, 34:179–186.
- Lindbäck, T., Fagerlund A., Rødland M.S., Granum P.E., (2004) “Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin”. *Microbiology* 150: 3959–3967.
- Logan N.A. & De Vos P., (2009) “Genus I. *Bacillus*” Cohn 1872, 174AL. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3 (De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K-H .& Whitman W.B., eds). Springer, New York, pp. 21–128.
- Logan Nial A., (2011) “*Bacillus* and relatives in foodborne illness”. *Journal of Applied Microbiology* 112:417-429.
- Loralyn H., Ledenbach and Robert T. Marshal, (2009) “Microbiological Spoilage of Dairy Products”. *Food Microbiology and Food Safety*, DOI 10.1007/978-1-4419-0826-1_2.
- Lücking G., M. Stoeckel, Z. Atamer, J. Hinrichs, M. Ehling-Schulz, (2013) “Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage”. *International Journal of Food Microbiology* 166:270-279.
- Lund, T., Granum P.E., (1996) “Characterization of a non–haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak”. *FEMS Microbiol. Lett.*, 141:151–156.
- Madegowda M., Eswaramoorthy S., Burley S.K., Swaminathan S., (2008) “X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*”. *Proteins* 71:534–540.
- Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bär W. & Krähenbühl S., (1997) “Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*”. *N Engl J Med* 336: 1142–1148.
- Maiden M. C.J., (2006) “Multilocus Sequence Typing of Bacteria”. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:561–88.
- Mayo B., Rachid C.T., Alegría A., Leite A.M., Peixoto R.S., Delgado S., (2014) “Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology”. *Curr. Genomics.* 15:293-309.
- Meer R.R., Baker J., Bodyfelt F.W. & Griffiths M.W., (1991) “Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review”. *J. Food Prot.* 54:969–979.

- Mei X., K. Xu, L. Yang, Z. Yuan, J. Mahillon and X. Hu, (2014) “The genetic diversity of cereulide biosynthesis gene cluster indicates a composite transposon *Tnces* in emetic *Bacillus weihenstephanensis*”. *BMC Microbiology*, 14:149.
- Metzker M.L., (2010) “Sequencing technologies - the next generation”. *Nat. Rev. Genet.*, 11: 31-46.
- Mizrahi-Man O., Davenport E.R., Gilad Y., (2014) “Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs *PLoS One*”. 2013; 8(1).
- Moliné M., Libkind D., van Broock M., (2012) “Production of torularhodin, torulene, and β -carotene by *Rhodotorula* yeasts”. *Methods Mol. Biol.*, 898:275-83.
- Mols M., R. van Kranenburg, M. H. Tempelaars, W. van Schaik, R. Moezelaar, T. Abee, (2010) “Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks”. *Intern. Food Microb.* 137:13–21.
- Morozova O., and Marra M.A., (2008) “Applications of next- generation sequencing technologies in functional genomics”. *Genomics*, 92:255–264.
- Mucchetti G., Carminati D., Parisi A., (2002) “Ricotta fresca vaccina ed ovina: osservazioni sulle tecniche di produzione e sul prodotto”. *Latte*, 27 (2): 154-166.
- Mucchetti G. and Neviani, E., (2006) “Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia qualità e sicurezza”. Milano. *Tecniche Nuove*, 131, 165-168, 363-382.
- Nadkarni M.A., Martin F.E., Hunter N., and Jacques N.A., (2009) “Methods for optimizing DNA extraction before quantifying oral bacterial numbers by *real-time* PCR”. *FEMS Microbiol. Lett.*, 296:45-51.
- Ngamwongsatit P., Buasri W., Pianariyanon P., Pulsrikarn C., Ohba M., Assavanig A., Panbangred W., (2008) “Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers”. *Int. J. Food Microbiol.* 121:352–356.
- Nocker A., M. Burr, and K. Camper., (2007) “Genotypic microbial community proling: a critical technical review”. *Microbial Ecology*. 54: 276-289.

- O’Flaherty S. and Klaenhammer, T. R., (2011) “The impact of Omic technologies on the study of food microbes”. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2: 353–371.
- O’Sullivan D.J., Giblin L., McSweeney P.H., Sheehan J.J. and Cotter P.D., (2013) “Nucleic-acid based approaches to investigate microbial-related cheese quality defects”. *Frontiers in Microbiology* Vol.4, Article 1.
- Páčová Z., P. Švec, P. Stenfors, M. Vyletěllová, I. Sedláček., (2003) “Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow’s milk”. *Czech J. Anim. Sci.*, 48 (2): 93–96.
- Petrosino J., F. Highlander, S. Luna, R. A. and Gibbs., (2009) "Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification." *Clinical Chemistry*, 2009: 856–866.
- Quigley L., O’Sullivan O., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F. and Cotter P.D., (2011) “Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese”. *Int. J. Food. Microbiol.*, 150: 81–94.
- Quigley L., O’Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Paul Ross R., Fitzgerald G.F., and Cotter, P.D., (2012) “The complex microbiota of raw milk”. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5):664-98.
- Quigley L., O’Sullivan O., Stanton C., Beresford TP., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D., (2013). “The complex microbiota of raw milk”. *J Dairy Sci.* 96(8):4928-37.
- Senesi S. e E. Ghelardi, (2010) “Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins”. *Toxins* 2:1690-1703.
- Setlow P., (2014) “Germination of spores of *Bacillus species*: what we know and do not know”. *J. Bacteriol.* 196(7):1297-305.
- Spiegelman D., Gavin W. and Greer W.C., (2005) "A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities". *Can. J. Microbiol* 2005: 355-386.
- Stelder Sacha K., Siraje A. Mahmud, Henk L. Dekker, Leo J. de Koning, Stanley Brul and Chris G. de Koster, (2015) “Temperature Dependence of the Proteome Profile of the Psychrotolerant Pathogenic Food Spoiler *Bacillus weihenstephanensis* Type Strain WSBC 10204”. *J. Proteome Res.* 14:2169–2176.
- Stenfors Arnesen L.P., Fagerlund A., Granum P.E., (2008) “From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins”. *FEMS Microbiol. Rev.* 32(4):579-606.

Switt Andrea I. Moreno, Alexis D. Andrus, Matthew L. Ranieri, Renato H. Orsi, Reid Ivy, Henk C. den Bakker, Nicole H. Martin, Martin Wiedmann and Kathryn J. Boor, (2014) “Genomic comparison of sporeforming bacilli isolated from milk”. BMC Genomics 15:26.

Thorsen L., Hansen B.M., Nielsen K.F., Hendriksen N.B., Phipps R.K., Budde B.B., (2006) “Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium”. Appl. Environ. Microbiol. 72(7):5118-21.

Tran Seav-Ly, Elisabeth Guillemet, Michel Gohar, Didier Lereclus, and Nalini Ramarao, (2010) “CwpFM (EntFM) Is a *Bacillus cereus* Potential Cell Wall Peptidase Implicated in Adhesion, Biofilm Formation, and Virulence”. Journal of Bacteriology, p. 2638–2642.

Vitagliano M., (2005) “Tecnologie e trasformazioni dei prodotti agrari”. Calderini edagricole 490-492.

Yang I.C., D. Y. Shih, T. P. Huang, Y.P. Huang, J. Y. Wang, and T.M. Pan., (2005) “Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group”. J. Food Prot. 68: 2123-2130.

Zimecki M. and Kruzel M.L., (2007) “Milk derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value”. J. Exp. Ther Oncol. 6:89–106.

RINGRAZIAMENTI:

Sembra strano che, dopo aver scritto una tesi mi manchino le parole proprio per ringraziare le persone che mi hanno aiutata in questa mia impresa.

Prima tra tutti devo ringraziare la prof.ssa Cardazzo Barbara per avermi accettata nel suo laboratorio e per avermi affidato la mia amata tesi sulle “Ricotte”.

È una persona veramente speciale in grado di capire i problemi degli studenti e di consigliarti e rincuorarti nei momenti più tristi come in un brutto voto o in una PCR non riuscita.

In secondo luogo devo ringraziare con tutto il cuore i miei angeli custodi: Nadia, Eleonora e Lisa; voglio dirvi che vi adoro! È stato un onore lavorare in laboratorio con voi, mi avete aiutata tantissimo nella stesura della tesi. Vi porterò sempre nel mio cuore.

Ora l'onore va alla mia famiglia senza la quale tutto questo non sarebbe stato possibile, mi avete sempre spinto ad andare avanti nonostante i miei sbalzi d'umore e le mie paure di non farcela.

Andrea, fidanzati da così poco tempo ma a me sembra una vita, sei il miglior fidanzato che potessi mai avere. Grazie per avermi sopportata tante volte e spero che il futuro ci riservi qualcosa di “speciale” per noi.

Grazie a tutti i miei parenti: nonni, zii, zie, cugini, cugine, suoceri e cognata. Ringrazio anche i “Figli di Zorro”, che son sicura che se loro regaleranno una festa indimenticabile a me, io regalerò a loro questa dedica.

Ed infine grazie a tutti i miei compagni di corso con il quale ho condiviso questi anni di carriera universitaria, ma soprattutto grazie ad: Angelica, Silvia, Roberta e Valentina.

