



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

Studio delle comunità microbiche in cereali autunno-vernini insilati
addizionati con batteri lattici Omofermentanti ed Eterofermentanti

Relatore: Prof.ssa Barbara Cardazzo

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Correlatore: Prof. Luca Fasolato

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Laureanda

Luana Filippa Mellia

Matricola: 1237803

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Riassunto

L'insilamento è una tecnica molto antica che permette la conservazione prolungata di foraggi impiegati nell'alimentazione animale. In assenza di O₂ vi è lo sviluppo dei microorganismi anaerobi che fermentando gli zuccheri determinano l'acidificazione della massa vegetale aumentandone la stabilità, la qualità nutrizionale e quella microbiologica. La produzione di acido lattico da parte dei Batteri Lattici (*Lactic Acid Bacteria* LAB) risulta essere il principale fattore che favorisce la stabilità dell'insilato poiché determina la riduzione e il mantenimento del pH della massa vegetale a valori inferiori a 4 per tutto il periodo di insilamento. I LAB sono microorganismi naturalmente presenti nel foraggio fresco ma spesso la loro bassa concentrazione non consente l'instaurarsi di un buon processo fermentativo e questo compromette la qualità del prodotto finale. Per questo motivo vengono molto spesso impiegati delle colture starter di LAB (inoculi) per migliorare il processo fermentativo e ottenere con più margine di sicurezza la fermentazione desiderata. In questo studio si è valutato l'impiego di due diverse colture starter di LAB, uno costituito da batteri lattici Eterofermentanti obbligati (KWS LACTOSTABILITY) e l'altro costituito da una miscela di batteri lattici Omofermentanti (KWS LACTOQUALITY). Ciascun inoculo è stato addizionato a tre trinciati di frumento o frumento misto avena raccolti in tre diverse Aziende agricole del Veneto; ogni trinciato è stato diviso in tre uguali frazioni a cui è stato aggiunto uno dei due inoculi oppure acqua (controllo). Diverse aliquote di ciascun trinciato sono state sottoposte ad insilamento per un tempo di 6 giorni (T6) mentre altre sono state insilate per un tempo di 60 giorni (T60). L'obiettivo di questa tesi è stato valutare in che modo i due diversi starter influissero sullo sviluppo delle comunità microbiche durante il processo fermentativo e come queste influenzassero la qualità del prodotto finale (pH). Accanto a questo si è valutata la possibile influenza del contenuto di sostanza secca (DM) del trinciato fresco, sull'evoluzione della fermentazione e della comunità microbica. A tale scopo sono stati impiegati due diversi approcci: coltura-dipendente e coltura-indipendente. Nel primo caso sono stati utilizzati terreni specifici per l'isolamento e la conta su piastra di tre target specifici: Batteri Lattici, Carica mesofila totale (CMT) e Muffe e Lieviti; le colonie tipiche di batteri lattici, muffe e lieviti sono state isolate, amplificate tramite PCR e sottoposte a sequenziamento Sanger del gene 16S rRNA/ ITS 1 e ITS 2 per l'identificazione di specie. Con l'approccio di Metabarcoding si è analizzata una porzione dello stesso gene 16S rRNA e sequenziato mediante piattaforma Illumina® Miseq 2x300 al fine di studiare e caratterizzare l'evoluzione delle comunità microbiche dall'inizio alla fine del processo di fermentazione. Tra i principali effetti derivanti dall'impiego di colture starter

rilevati in questo in questo studio vi è come l'impiego dei due inoculi abbia favorito la competizione dei LAB rispetto alla flora anaerobia autoctona. Lo starter eterofermentante ha determinato un incremento significativo dei LAB al termine della fermentazione rispetto al controllo e allo starter omofermentante. Quest'ultimo ha però consentito una maggiore acidificazione ($\text{pH} < 4,01$) degli insilati al termine dei 60 giorni e i bassi valori di pH sono correlati ad una maggiore qualità e conservabilità del prodotto. I diversi livelli di sostanza secca (DM) dei campioni hanno influenzato l'evoluzione della comunità microbica al termine della fermentazione e livelli elevati di DM (43.4%) sembrano favorire maggiormente la persistenza dei LAB eterofermentanti al termine della fermentazione.

Parole chiave: insilati, comunità microbica, *Lactic Acid Bacteria* (LAB), starter, sequenziamento NGS

Abstract

Ensiling is a very old technique that allows the prolonged preservation of fodder used in animal feed. In the absence of O₂ there is the development of anaerobic microorganisms that ferment sugars resulting in the acidification of the plant mass, increasing its stability, nutritional and microbiological quality. The production of lactic acid by Lactic Acid Bacteria (LAB) turns out to be the main factor that promotes silage stability due to the reduction and maintenance of the pH of the silage mass at values below 4 throughout the ensiling period. LAB are microorganisms naturally present in fresh forage but often their low concentration does not allow the establishment of a good fermentation process and this compromises the quality of the final product. Therefore, starter cultures of LAB (inoculums) are very often used to improve the fermentation process and achieve the desired fermentation with more margin of safety. This study has focused on the use of two different starter cultures of LAB, one consisting of obligate Heterofermenting lactic acid bacteria (*Lactobacillus buchneri*, KWS LACTOSTABILITY) and the other consisting of a mixture of Homofermenting lactic acid bacteria (KWS LACTOQUALITY). Each inoculum was added to three chopped, wheat or mixed oat wheat harvested from three different farms in the Veneto region. Each chopped was divided into three equal fractions to which either one of the two inoculums or water (control) was added. Different aliquots of each chop were ensiled for a time of 6 days (T6) or 60 days (T60). The objective of this thesis was to evaluate how the two different starters affected the development of microbial communities during the fermentation process and how these affected the quality of the final product (pH). Furthermore, the possible influence of the dry matter (DM) content of fresh chopped on the evolution of fermentation and microbial community was evaluated. Two different approaches were used for this purpose: culture-dependent and culture-independent. In the former, specific media were used for the isolation and plate counts of three specific targets: Lactic Bacteria, Total Mesophilic Charge (CMT) and Molds and Yeasts; typical colonies of lactic acid bacteria, molds and yeasts were isolated, amplified by PCR and subjected to Sanger sequencing of the 16S rRNA/ ITS 1 and ITS 2 gene for species identification. Using the Metabarcoding approach, a portion of the same 16S rRNA gene was analyzed and sequenced using Illumina® Miseq 2x300 platform in order to study and characterize the evolution of microbial communities from the beginning to the end of the fermentation process. Among the main effects resulting from the use of starter cultures detected in this study is how the use of the two starters promoted LAB competition over native anaerobic flora. The heterofermenting starter resulted in a significant increase in LAB at the end of fermentation compared to the control and

homofermenting starter. However, the latter allowed higher acidification (pH < 4.01) of the silages at the end of 60 days, and the lower pH values correlated with higher product quality and shelf life. The different levels of dry matter (DM) of the samples influenced the evolution of the microbial community at the end of fermentation, and high levels of DM (43.4%) seemed to favor the persistence of heterofermentative LAB more at the end of fermentation.

Keywords: silage, microbial community, Lactic Acid Bacteria (LAB), starter, NGS sequencing

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Tecnica dell'Insilamento	1
1.1.1 Fasi del processo fermentativo	2
1.1.2 Utilizzo di colture starter nella produzione di insilati.....	4
1.2 Caratteristiche dei Batteri Lattici	5
1.2.1 Funzione probiotica dei Lattobacilli	6
1.3 Nuova tassonomia per i Lactic Acid Bacteria (LAB)	7
1.3.1 LAB omofermentativi ed eterofermentativi.....	9
1.4 Utilizzo di LAB omofermentanti ed eterofermentanti come starter	13
1.5 Caratterizzazione molecolare dei microorganismi	14
1.5.1 Metodi coltura-dipendenti e sequenziamento Sanger	14
1.5.2 Approcci coltura-indipendente e Next Generation Sequencing (NGS)	14
1.5.3 DNA Metabarcoding per lo studio di comunità batteriche	16

2. Scopo della tesi

18

3. Materiali e metodi

19

3.1 Inoculazione starter e raccolta campioni	19
3.2 Analisi Microbiologica	20
3.2.1 Preparazione Terreni	21
3.2.2 Semina, isolamento e conta delle colonie.....	24
3.2.3 Selezione e stoccaggio colonie	25
3.3 Analisi molecolari coltura-dipendente	26
3.3.1 Estrazione DNA da Lattobacilli.....	26
3.3.2 Estrazione DNA muffe e lieviti	26
3.3.3 Amplificazione	27
3.3.4 Corsa elettroforetica su gel	28
3.3.5 Purificazione e diluizione dei campioni	29
3.4 Analisi molecolari coltura-indipendente	31
3.4.1 Estrazione del DNA	31
3.4.2 Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto	32

3.5 Preparazione delle librerie dell'amplicone 16S per sequenziamento NGS	32
3.5.1 Primo step di PCR.....	33
3.5.2 Purificazione dei prodotti di PCR	34
3.5.3 Secondo step di PCR	36
3.5.4 Purificazione dei prodotti di PCR	37
3.5.5 Quantificazione con metodo fluorimetrico e pooling della libreria.....	38
3.5.6 Valutazione quantitativa del pool della libreria	39
3.5.7 Valutazione qualitativa del pool della libreria	39
3.6 Analisi chimiche ed elaborazioni statistiche della conta microbica	40
3.6.1 Analisi delle sequenze Sanger	40
3.6.2 Allineamenti globali e analisi filogenetica	41
3.7 Analisi bioinformatiche dei dati NGS	41
3.7.1 QIIME2.....	42
3.7.2 MicrobiomeAnalyst	43
4. Risultati e discussione	45
4.1 Risultati delle conte	45
4.2 Risultati del sequenziamento Sanger	49
4.2.1 PCR.....	49
4.2.2 Sequenziamento Sanger	50
4.2.3 Risultati Sanger T0	51
4.2.4 Risultati Sanger T6	53
4.2.5 Risultati Sanger T60	55
4.3 Risultati analisi della comunità con sequenziamento NGS	58
4.3.1 Valutazione dell'effetto degli inoculi sulla comunità microbica degli insilati di cereali autunno-vernini	58
4.4 Valutazione dell'alpha-diversity.....	61
4.4.1 Generi più abbondanti in relazione alla tesi e al tempo	64
4.4.2 Generi più abbondanti in relazione alle diverse aziende (DM) e al tempo.....	65
4.4.3 Principali considerazioni sull'evoluzione della comunità microbica nell'insilato finale (T60).....	67
4.6 Influenza dell'utilizzo dei differenti starter sul pH al termine della fermentazione.....	71
4.6.1 Risultati T60 per tesi	72

4.6.2 Risultati T60 per Azienda (DM).....	73
-------------------------------------------	----

5 Conclusioni.....	75
---------------------------	-----------

6 Bibliografia.....	77
----------------------------	-----------

1.INTRODUZIONE

1.1 Tecnica dell'Insilamento

L'insilamento è la tecnica più comune per la conservazione dei foraggi destinati all'alimentazione dei ruminanti. Si basa su due meccanismi primari di conservazione: l'assenza di ossigeno e il concomitante sviluppo di microorganismi anaerobi che fermentano i carboidrati solubili in acqua (WSC) della pianta producendo acidi organici e riducendone progressivamente il pH (*Oliveira et al., 2017*). Dell'utilizzo di questa tecnica si hanno antichissime testimonianze: alcuni dipinti murali in Egitto risalenti ad un'età compresa tra il 1000 e il 1500 a.C. mostrano come diverse colture vegetali venissero conservate tramite insilamento. A partire dal 1900 l'insilamento è diventata una tecnica comune sia in Europa che in Nord America per la conservazione delle colture complice anche l'invenzione del silo a torre nel Wisconsin nel 1889 (*Muck et al., 2007*). L'alternativa alla conservazione tramite insilamento è la fienagione ovvero l'essiccazione del foraggio fino al raggiungimento di bassi livelli di umidità (circa del 15%) che può essere svolta tramite essiccazione al sole o con sistemi di ventilazione ad aria calda (*Rumi, 2015*). La scelta di una delle due tecniche oltre ad essere influenzata dalla tecnologia disponibile e dal clima (il clima umido tipico del Nord Europa sfavorisce la fienagione) tiene fatto di una serie di svantaggi della fienagione rispetto all'insilamento. Tali svantaggi riguardano principalmente le perdite di sostanza secca (DMS) che con la fienagione possono arrivare fino al 30% mentre con l'insilamento si aggirano tra il 2-8%, inoltre le colture di insilati sono meno dipendenti dalle condizioni meteorologiche e questo consente di raccogliere la coltura allo stadio di maturazione ottimale per ottenere un elevato valore nutrizionale (*Pahlow et al., 2003*). Un altro aspetto da considerare nella scelta delle due tecniche riguarda la qualità del prodotto finale: l'insilamento essendo un processo biologico dinamico permette di ottenere un prodotto stabile dall'elevata qualità nutrizionale e microbiologica, più digeribile rispetto al raccolto fresco (*Carvalho et al., 2020*). Nel Nord Italia (Piemonte, Lombardia, Trentino Alto Adige, Veneto, Emilia-Romagna) il sistema di alimentazione bovino si basa principalmente sull'insilato di mais (pianta intera o granella) per via del clima favorevole alla sua coltivazione, come le alte temperature estive e la disponibilità di acqua per l'irrigazione (*Migliorati et al., 2017*). Tuttavia secondo l'Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT) terreni destinati alla produzione di insilato di mais sono aumentati del

146% nel periodo che va dal 2006 al 2019, mentre quelli destinati alla produzione di orzo insilato sono aumentati di oltre il 186%. Le colture di cereali autunno-vernini possono essere coltivate in quegli ambienti caratterizzati da estati calde e siccitose e hanno un minore fabbisogno di acqua di irrigazione rispetto al mais (*Migliorati et al. 2017*). L'interesse sempre maggiore su queste colture è incoraggiato quindi dalla volontà di incrementare l'utilizzo di colture meno esigenti da un punto di vista idrico e che si adattino ad un clima più arido e secco in vista della riduzione delle precipitazioni del prossimo trentennio (*Giorgi et al., 2008*).

1.1.1 Fasi del processo fermentativo

Nella figura 1 (*Ferrero et al., 2020*) sono illustrate le principali fasi del processo di insilamento in cui prevale la fermentazione degli zuccheri ad acido lattico ad opera dei LAB e si distinguono 4 fasi principali:

- **Fase 1** → aerobica iniziale – Inizia subito dopo lo sfalcio del foraggio e continua dopo la chiusura del silo; in questa delicata fase iniziale i principali aspetti che influenzeranno tutto il processo fermentativo sono: il contenuto zuccherino della pianta (il più alto possibile), la presenza di contaminazione di terra e la velocità con cui la massa viene compattata e l'ossigeno eliminato. In questa fase la flora epifita della pianta attraverso la respirazione aerobia consuma l'ossigeno presente e gli enzimi vegetali rimangono attivi e tra questi le carboidrasi aumentano la quantità di carboidrati solubili disponibili per la fermentazione (*Pahlow et al., 2003*).
- **Fase 2** → fase fermentativa principale – questa fase inizia quando tutto l'ossigeno è stato consumato, è dominata dai microorganismi anaerobi (LAB) che iniziano la fermentazione degli zuccheri producendo principalmente acido lattico e acido acetico abbassando il pH a valori <4
- **Fase 3** → fase di stabilizzazione – in questa fase si riduce l'intensità del processo di fermentazione e la massa insilata si mantiene stabile. I LAB subiscono in genere una riduzione logaritmica di circa 3 volte rispetto al picco e diverse specie di lieviti altamente acido tolleranti possono sopravvivere in uno stato quasi inattivo insieme alle endospore di bacilli e clostridi (*Pahlow et al., 2003*). In presenza di LAB eterofermentanti come *Lentilactobacillus buchneri* si assiste al metabolismo del lattato in cui la co-fermentazione di esosi e lattato produce acetato e 1,2-propandiolo come prodotti principali (Gänzle,

2015).

- **Fase 4** → fase di consumo all'apertura del silo – in questa fase l'ossigeno penetra nella massa insilata e si può assistere al deterioramento aerobico dell'insilato dovuto alla proliferazione dei lieviti e le spore o i conidi di alcune muffe; è un evento estremamente negativo e per limitarlo è documentato l'utilizzo di specie eterofermentative come *Lentilactobacillus buchneri* che producono acido acetico che aumenta la stabilità aerobica inibendo direttamente muffe e lieviti (Muck et al., 2018).

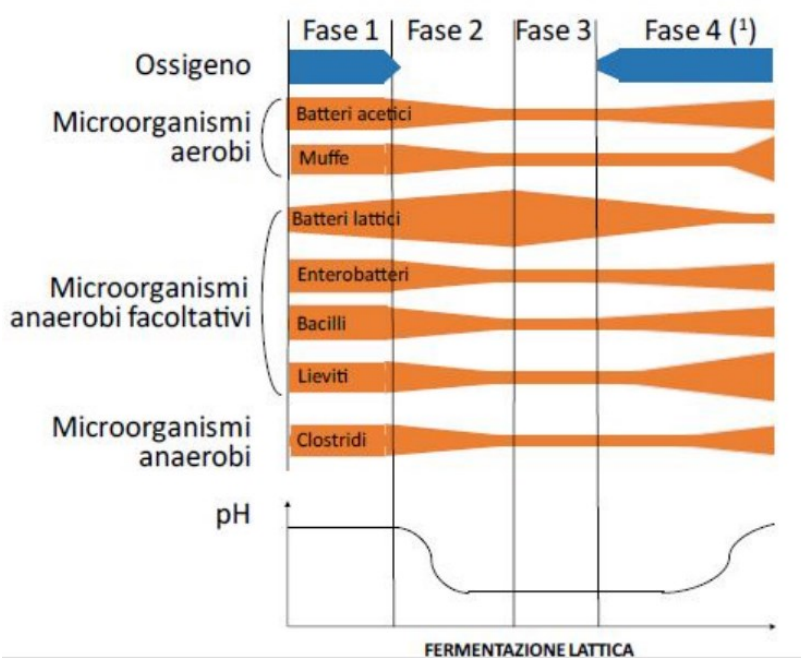


Figura 1 Evoluzione dei principali gruppi di microorganismi e del pH durante le fasi dell'insilamento in cui prevale la fermentazione lattica (Ferrero et al. 2020)

Come detto, in queste diverse fasi i fattori che influenzano la qualità del processo fermentativo e di conseguenza del prodotto finito sono molteplici e comprendono sia fattori gestionali che intrinseci del foraggio. Tra i fattori legati alla gestione del processo di insilamento i più impattanti riguardano lo stadio di raccolta della pianta, la velocità di confezionamento, la compattazione e porosità del prodotto, la contaminazione con il suolo, la lunghezza della trinciatura, la tipologia di silo impiegato e l'eventuale utilizzo di additivi (Muck et al. 2007, Kung et al., 2018). Tra i principali fattori intrinseci relativi al foraggio fresco che possono influenzare la fermentazione vi sono l'umidità, la capacità tampone della pianta che è influenzata dal contenuto proteico e dalle ceneri, il contenuto di zuccheri solubili (WSC), la flora microbica epifita (Muck et al. 2007, Kung et al. 2018).

1.1.2 Utilizzo di colture starter nella produzione di insilati

Il Regolamento CE 1831 del 2003 disciplina le tipologie di additivi che possono essere addizionate ai mangimi e include tutte quelle sostanze, compresi enzimi o microrganismi, che possono essere addizionate agli insilati. L'insilamento tradizionale sfrutta i batteri lattici epifitici (LAB) della pianta che in condizioni di anaerobiosi avviano la fermentazione degli zuccheri producendo acidi organici (principalmente acido lattico) e riducono il pH della massa vegetale a valori al di sotto di 5 o 4. Tuttavia la concentrazione di LAB naturalmente presenti sulla pianta fresca è estremamente variabile e va da 10^5 ufc/g⁻¹ sull'erba medica (*Medicago sativa* L.) a 10^7 ufc/g⁻¹ in mais (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.), ed è influenzata da vari fattori come ad esempio lo stadio di maturazione della pianta (Pahlow et al., 2003). L'esito della fermentazione naturale, senza l'aggiunta di starter microbici, dipende da quali microrganismi diverranno predominanti durante il processo: LAB o non LAB. Durante la fase fermentativa principale infatti, i microrganismi anaerobi facoltativi e obbligati, come gli enterobatteri, i clostridi, alcuni bacilli e i lieviti, competono con i LAB per i nutrienti, che vengono rilasciati dalle cellule e dai tessuti vegetali in via di esaurimento (Pahlow et al., 2003). Il ruolo dei batteri lattici produttori di acido lattico è centrale e fondamentale nel processo di insilamento così come lo sviluppo di clostridi, bacilli, muffe e lieviti è implicato nel deterioramento dell'insilato (McAllister et al., 2018). Per migliorare la conservabilità e il processo di fermentazione degli insilati da decenni vengono impiegati diverse colture starter, che oltre ad influenzare il processo fermentativo hanno dimostrato degli effetti sugli animali in termini di incremento nella produzione di latte (Muck et al. 2018), una maggiore tendenza negli animali ad incrementare il consumo di sostanza secca e un incremento nel latte di grasso, proteine e lattosio (Carvalho et al., 2020). I fattori che possono influire sul maggior beneficio degli insilati inoculati e che determinano miglioramenti nelle prestazioni degli animali sono difficili da spiegare; (Muck et al., 2018) questi possono dipendere all'inibizione da parte degli starter di microrganismi patogeni che potrebbero produrre composti tossici e indesiderati (butirrato, ammoniaca etc.) ma anche dalla possibile interazione tra starter e microbiota ruminale che potrebbe portare a cambiamenti nella fermentazione ruminale come ad esempio la riduzione della produzione di metano (Carvalho et al., 2020).

1.2 Caratteristiche dei Batteri Lattici

I batteri lattici (LAB Lactic Acid Bacteria) sono un gruppo funzionale di microorganismi estremamente eterogeneo appartenenti al phylum *Firmicutes*, con "basso" (≤ 55 mol %) contenuto di G+C nel DNA. Appartengono alla classe dei Bacilli, ordine Lactobacillales e famiglia delle Lactobacillaceae e occupano un'ampia gamma di nicchie. Tale gruppo di microorganismi comprende cocci o bastoncini Gram-positivi, non sporigeni, acido-tolleranti anaerobi o aerobi facoltativi che pur conservando la capacità condizionale di respirazione basano il loro metabolismo sulla fermentazione degli zuccheri in acidi organici. (Zheng et al., 2020) La loro temperatura di crescita varia da 5°C a oltre 50°C, con valori ottimali compresi tra 25 e 40°C. e il pH ottimale per la crescita è compreso tra 5 e 6 (Pahlow et al., 2003). Proprio grazie al loro metabolismo fermentativo i LAB svolgono da sempre un ruolo prioritario nell'approvvigionamento mondiale di cibo, essendo responsabili delle bioconversioni nei prodotti lattiero caseari, nelle verdure e carni fermentate, nella produzione di vino caffè ed insilati (Makarova et al., 2006). I LAB hanno esigenze nutrizionali molto rigide in termini di aminoacidi, peptidi, vitamine, sali, acidi grassi e carboidrati fermentabili (Zheng., et al. 2020, Pahlow et al., 2003). Nel corso della loro evoluzione hanno subito un processo di riduzione del proprio genoma, perdendo in media 3000 geni dall'antenato comune per adattarsi ad una nicchia ecologica ristretta (Duar et al., 2017, Gänzle, 2015). Molti dei geni persi erano coinvolti nella biosintesi dei cofattori e nella sporulazione indicando lo spostamento verso uno stile di vita in ambienti ristretti ricchi di nutrienti (Klaenhammer et al., 2008). Accanto agli eventi di perdita dei geni è stata ampiamente documentata nell'ordine delle *Lactobacillales* l'acquisizione di geni tramite eventi di trasferimento genico orizzontale (HGT) mediato da batteriofagi o tramite coniugazione, così come gli eventi di duplicazione genica. I geni legati alla produzione di batteriocine così come quelli legati al trasporto di zuccheri e peptidi sembrano essere tra quelli spesso trasferiti tramite HGT (Makarova et al., 2006). La riduzione del genoma ha determinato una riduzione dell'efficienza metabolica e della versatilità consentendo ai LAB di vivere in ambienti ferro-privi in cui la crescita batterica è limitata (Gänzle, 2015). L'adattamento più o meno intenso ad un habitat ecologico ha permesso di classificare i vari gruppi sulla base del loro stile di vita: a vita libera, adattati all'ospite e nomadi (Martino et al., 2016, Duar et al., 2017).

1.2.1 Funzione probiotica dei Lattobacilli

I LAB sono intimamente associati alla cultura e al benessere dell'uomo; essi sono membri significativi del microbiota sia dell'uomo che degli animali e sono presenti in gran numero nelle mucose della cavità orale, dell'intestino e nel canale vaginale. Normalmente in un individuo sano sono presenti nella cavità orale (10^3 - 10^7 CFUg⁻¹), nell'ileo (10^3 - 10^7 CFUg⁻¹), nel colon (10^4 - 10^8 CFUg⁻¹). (Bernardeau et al., 2007) Visto il loro storico utilizzo nell'alimentazione umana molte specie di LAB hanno avuto il riconoscimento di Generally Recognized as Safe (GRAS) e di Presunzione Qualificata di Sicurezza (QPS) da parte della Food and Drug Administration e dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (Sun et al., 2015). La presenza dei Lattobacilli come normali commensali della flora dei mammiferi, la loro ubiquità nell'ambiente, la loro presenza in alimenti freschi (verdura e carne) e in alimenti conservati ha contribuito a ritenerli sicuri (Adams et al., 1995). La convinzione che i Lattobacilli apportassero benefici alla salute dell'uomo ha origini antiche, nel 1907 Metchnikoff ipotizzò come la presenza di batteri nell'organismo influenzasse il benessere dell'ospite e dato che i batteri lattici e la fermentazione lattica è utile nel contrastare i fenomeni putrefattivi degli alimenti potrebbero esercitare la stessa funzione nel tubo digerente (Capruso, 2016). Il termine "probiotico" è stato utilizzato per la prima volta nel 1965 per indicare una sostanza secreta da un microorganismo che stimola l'accrescimento di un altro microorganismo in contrasto quindi con la definizione di un antibiotico (Capruso, 2016). Ad oggi la definizione di probiotico è quella fornita dal lavoro congiunto del World Health Organization (WHO) e dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) sulle linee guida per la valutazione dei probiotici che li definisce come "microorganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite". Generalmente i microorganismi utilizzati come probiotici devono essere sicuri (GRAS), vivi, resistenti a pH acidi (per poter sopravvivere allo stomaco) ma anche a pH alcalini intestinali (Sali biliari) e aderire alla mucosa intestinale. Negli ultimi anni l'utilizzo di microorganismi vivi come probiotici ha notevolmente aumentato l'interesse industriale verso questi microorganismi; ad oggi lo stato attuale delle evidenze suggerisce come molti degli effetti benefici dei probiotici siano specifici di un ceppo o di una specie e non per forza rilevabili in specie o ceppi affini (Klaenhammer et al., 2008). Un'analisi genomica comparativa è stata condotta da Klaenhammer et al. 2008 tra 4 ceppi di Lactobacillus, tipicamente impiegate come probiotici (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii* e *Lactiplantibacillus plantarum*) il cui genoma è stato completamente sequenziato e comparato con 25 genomi di batteri lattici precedentemente

sequenziati e disponibili nei database. È stata rilevata la presenza di geni ceppo-specifici e geni invece specifici del gruppo dei LAB, che potrebbero essere correlati alla loro azione probiotica. Tra le regioni genomiche più importanti rilevate nel gruppo dei LAB vi sono quelle che codificano proteine di superficie che possono avere un ruolo nell'adesione cellulare. Un altro gruppo di geni identificato è rappresentato da quelli codificanti per i sistemi di trasporto degli zuccheri e geni coinvolti nei processi di idrolisi di carboidrati complessi, e non digeribili (NDO) come i fruttoligosaccaridi, che vengono impiegati come prebiotici (Klaenhammer *et al.*, 2008).

1.3 Nuova tassonomia per i Lactic Acid Bacteria (LAB)

Una prima classificazione dei batteri lattici risale alla monografia di Orla-Jensen (1919) ed era basata sulle caratteristiche fenotipiche quali la morfologia cellulare, le modalità di fermentazione e di utilizzo dei carboidrati e gli intervalli di temperatura di crescita. Orla-Jensen aveva classificato i batteri lattici in quattro generi (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*). Tale suddivisione ha rappresentato a lungo un importante criterio di classificazione tassonomica, anche se lo sviluppo dei moderni sistemi di classificazione, in particolare quelli basati sulle tecniche di biologia molecolare hanno aumentato notevolmente il numero dei generi all'interno dei LAB (Lahtinen *et al.*, 2012). Dagli inizi degli anni '80 la somiglianza dei geni 16S rRNA è stata sfruttata come criterio di base per la classificazione e la nomenclatura dei Lattobacilli (Zheng *et al.*, 2020). La presenza di un database quasi completo di sequenze del gene 16 S rRNA per i ceppi tipo delle specie procariotiche ha di molto aiutato a verificare l'appartenenza di un nuovo ceppo ad una specie nota, tuttavia gli alberi filogenetici costruiti sulla base dei singoli geni non hanno una risoluzione sufficiente per rivelare le interazioni filogenetiche dei diversi cladi e convalidare la tassonomia a livello di genere (Zheng *et al.*, 2020). Visto lo sviluppo e l'enorme potenziale delle piattaforme di sequenziamento di Next Generation Sequencing (NGS) che generano dati ad alto rendimento e a basso costo, diversi autori hanno proposto di sfruttare la similarità di interi genomi per l'identificazione di specie e per indagare sulle relazioni filogenetiche tra le specie in virtù del fatto che la pressione evolutiva agisce sull'intero organismo e non soltanto su un sottoinsieme di geni. (Inglin *et al.*, 2018) Sono stati identificati una serie di indici denominati complessivamente come indici di parentela genomica globale (OGRI overall genome related index) (Chun *et al.*, 2018). Alcuni di questi indici sono stati alla base della riclassificazione tassonomica del genere *Lactobacillus* eseguita nel 2020 da Zheng *et al.*, Gli indici utilizzati sono stati: l'identità nucleotidica media ANI

(Average Nucleotide Identity), l'identità aminoacidica media AAI (Average Aminoacid Identity), l'identità aminoacidica media del core-genome (cAAI). Oltre a questi indici per la riclassificazione tassonomica delle Lactobacillaceae sono stati considerati anche la filogenesi del core-genome (ovvero l'insieme dei geni condivisi da tutti i genomi), i geni firma (ovvero quelle famiglie di geni presenti nei genomi di uno stesso clade e assenti in quelli di un clade diverso) e le caratteristiche ecologiche e metaboliche tra cui il metabolismo omo ed eterofermentativo dei carboidrati indagato in questo lavoro di tesi. Il genere Lattobacillus comprende più di 200 specie caratterizzate da una diversità filogenetica e metabolica superiore alla diversità rilevabile all'interno di una famiglia batterica (Duar et al., 2017). La riclassificazione tassonomica ultimata nel 2020 da Zheng et al., si è basata sulle sequenze genomiche dei ceppi tipo depositati in banca dati (GeneBank) di tutte le specie delle *Lactobacillaceae* e ha portato all'identificazione all'interno della famiglia delle *Lactobacillaceae* di 31 cladi nettamente distinti e separati: di questi 31 lignaggi, 23 sono stati proposti come nuovi generi mentre i restanti 8 erano già stati descritti (*Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Oenococcus* e *Leuconostoc*) (Qiao et al., 2022). Attualmente l'identificazione di nuove specie viene eseguita combinando gli indici di identità genomica OGRI (overall genome related index), con la somiglianza del gene rRNA 16S sfruttata come primo step per l'identificazione: se un nuovo ceppo identificato ha un valore di identità nucleotidica media (ANI) <95% rispetto a un ceppo noto e un valore di similarità del gene rRNA 16S < 98.7% il ceppo identificato può essere riconosciuto come una nuova specie. Il flusso di lavoro che porta all'identificazione di una specie è riportato Figura 2 tratta da (Chun et al., 2018).

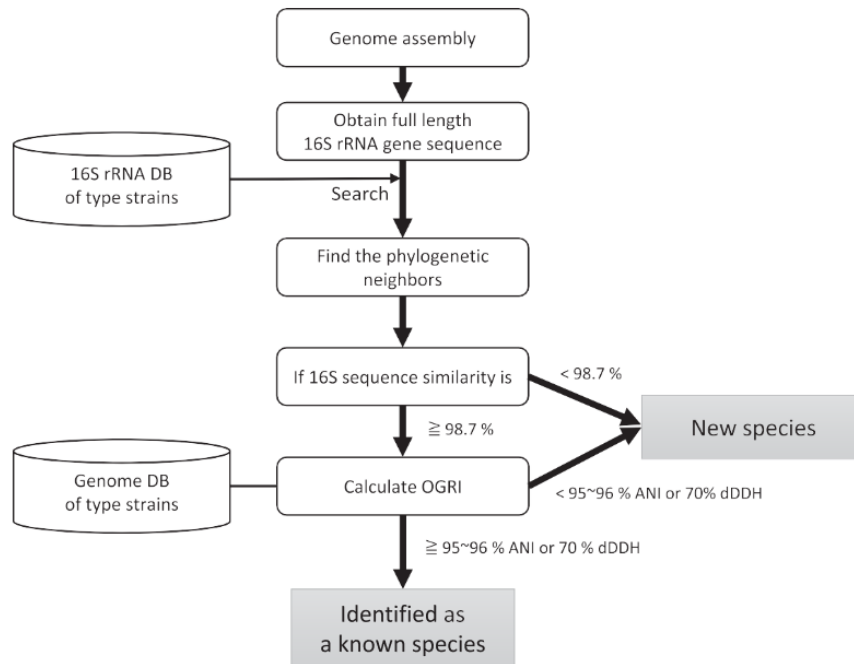


Figure 2 schema di lavoro per l'identificazione di una nuova specie basato sui valori di similarità del 16S rRNA e sugli indici di similarità genomica ripreso da Chun et al. 2018

1.3.1 LAB omofermentativi ed eterofermentativi

La nuova classificazione tassonomica dei LAB ha portato alla separazione distinta in due gruppi sulla base del metabolismo fermentativo: omofermentativo ed eterofermentativo che di fatto diviene un tratto distintivo a livello di genere. Gli organismi eterofermentativi formano un clade monofiletico distinto e separato rispetto agli organismi omofermentativi e l'anello di congiunzione evolutivo tra i due gruppi è rappresentato da *Lactiplantibacillus plantarum* (Zheng et al., 2020) (figura 3). Questa divisione a livello di genere ha dimostrato come la separazione filogenetica dei due gruppi è correlata al loro metabolismo; infatti i LAB pur essendo microaerofili nel corso della loro evoluzione hanno basato la loro ecologia e fisiologia sulla fermentazione degli zuccheri in acidi organici. Proprio sulle modalità di fermentazione degli zuccheri si è basata la tradizionale distinzione dei LAB in tre gruppi considerando la via utilizzata per il metabolismo dei carboidrati: la via di Embden- Meyerhof e la via della fosfochetolasi (Holzapfel et al., 2014).

- **Gruppo A:** omofermentativi obbligati. Più del 85% degli esosi è fermentato ad acido lattico attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). possiedono la fruttosio-1,6-bisfosfato-aldolasi, ma mancano di fosfochetolasi e quindi non fermentano né il gluconato né i pentosi.

- **Gruppo B:** eterofermentativi facoltativi in cui gli esosi vengono fermentati quasi esclusivamente in acido lattico attraverso la via EMP. Questi organismi possiedono sia l'aldolasi che la fosfochetolasi e quindi sono anche in grado di fermentare i pentosi (e spesso il gluconato). In presenza di glucosio, gli enzimi della via del fosfogluconato sono repressi.
- **Gruppo C:** Lattobacilli obbligatoriamente eterofermentanti. Gli esosi sono fermentati dalla via del fosfogluconato e producono lattato, etanolo (acido acetico) e CO₂ in quantità equimolare. I pentosi entrano in questa via e possono essere fermentati.

La suddivisione tra "omofermentativi obbligati" e "eterofermentativi facoltativi" non è idonea ad essere utilizzata come marcatore tassonomico poiché non tiene conto della via del pentoso fosfato per la fermentazione omofermentativa dei pentosi in lattato, correlata alla presenza di geni ceppo-specifici (Zheng *et al.*, 2015). Questa tradizionale classificazione in "omofermentativi obbligati" e "eterofermentativi facoltativi" può essere semplificata raggruppando i due gruppi in omofermentativi che metabolizzano gli esosi attraverso la via di Embden-Meyerhoff con il piruvato come intermedio metabolico chiave, e LAB eterofermentativi, che metabolizzano gli esosi attraverso la via della fosfochetolasi con piruvato e acetilfosfato come intermedi chiave. Il metabolismo dei pentosi è invece molto variabile a livello di specie e famiglia (Zheng *et al.*, 2020). Le differenze metaboliche tra i due gruppi sono correlate alla perdita, negli organismi eterofermentanti di famiglie geniche deputate al trasporto degli esosi, principalmente quelli coinvolti nei sistemi di fosfotransferasi (PTS) (Zheng *et al.*, 2015). Altre differenze a livello genomico tra i due gruppi sono legate al metabolismo e riguardano la presenza negli organismi omofermentanti di geni che codificano per la fosfofruttochinasi (Pfk) e la 1,6-bifosfato aldolasi, due enzimi chiave della via di Embden-Meyerhoff assenti invece nella maggior parte degli organismi eterofermentanti (Zheng *et al.*, 2015, Sun *et al.*, 2015). Un'altra differenza riguarda la presenza della mannitolo deidrogenasi (mdh) e dell'aldeide/alcool deidrogenasi che combina i due domini dell'acetil coenzima A (acetil-CoA) e dell'alcol deidrogenasi presente negli organismi eterofermentanti e solo sporadicamente in quelli omofermentanti (Zheng *et al.*, 2015). Queste differenze genomiche consentono la suddivisione dei LAB nei due gruppi, omofermentanti ed eterofermentanti sulla base della via utilizzata per la fermentazione degli esosi, dei sistemi di trasporto dei carboidrati e dell'intermedio metabolico chiave. Da una parte gli omofermentanti fermentano gli esosi attraverso la glicolisi e i carboidrati sono trasportati in modo preferenziale attraverso i sistemi fosfotransferasi PTS, il

piruvato è il punto di ramificazione del metabolismo mentre negli eterofermentanti il glucosio è fermentato tramite la via dei pentoso fosfati i sistemi fosfotransferasi PTS non sono funzionali e il punto centrale di ramificazione del metabolismo è l'acetil-fosfato (*Gänzle et al., 2015*). La fermentazione omolattica è più vantaggiosa a livello energetico poiché produce 2 molecole di ATP per ogni molecola di glucosio mentre nella fermentazione eterolattica la resa è limitata ad 1 mole di ATP se l'acetil-fosfato intermedio viene ridotto ad etanolo (*Lahtinen et al., 2012*). Per questo motivo gran parte degli organismi eterofermentanti cresce male con il glucosio come unica fonte di carbonio e per aumentare la fitness ecologica utilizzano preferenzialmente i disaccaridi che combinata alla presenza di accettori di elettroni alternativi consente di ridurre l'acetil-fosfato ad acido acetico e aumentare la resa a 2.5 molecole di ATP per glucosio (*Gänzle, 2015, Duar et al. 2017*).

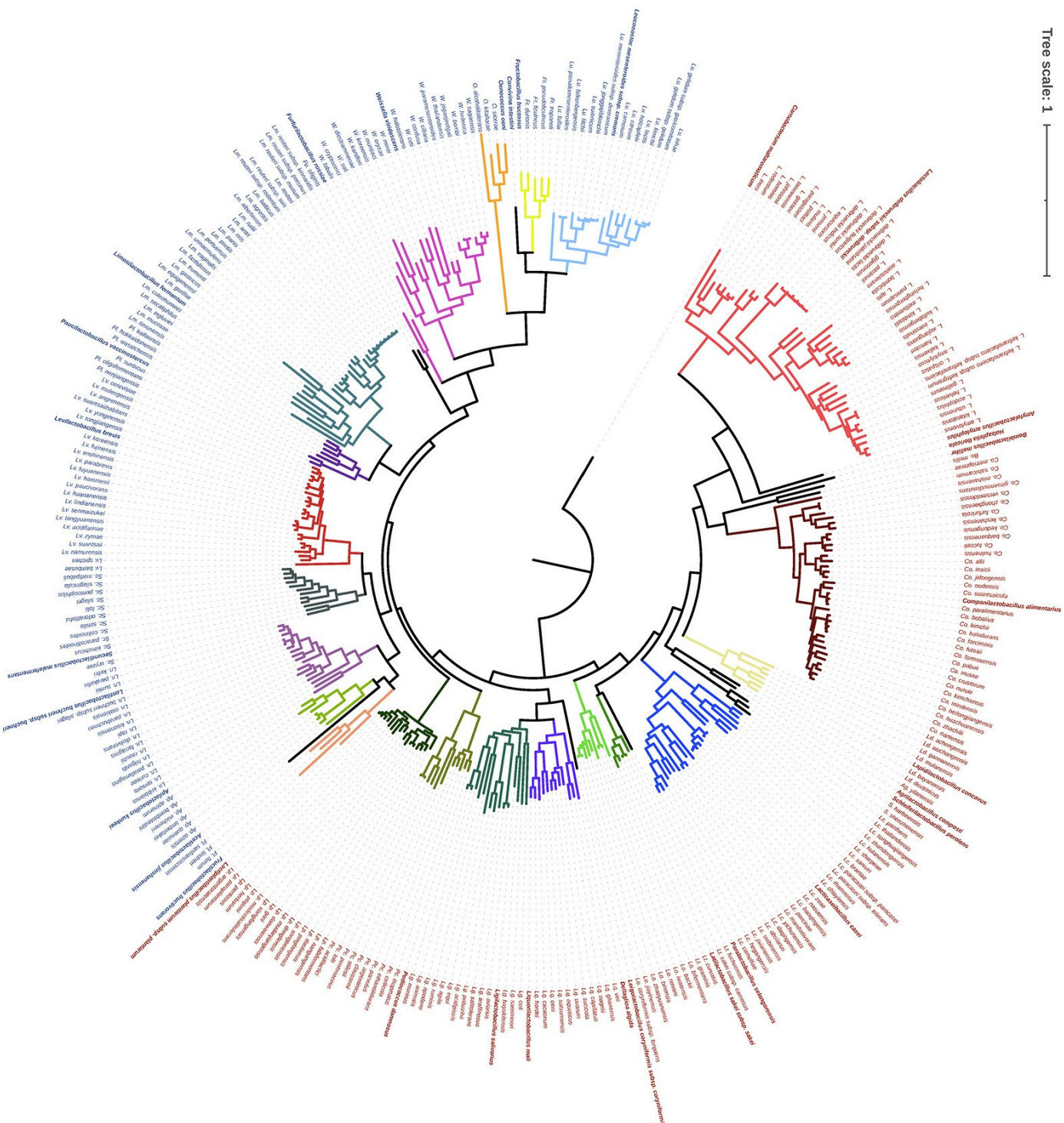


Figura 3. Albero filogenetico di 336 ceppi tipo delle Lactobacillaceae con *Carnobacterium maltaromaticum* come Outgroup Le specie omofermentative ed eterofermentative sono indicati rispettivamente in rosso e in blu. (Qiao et al. 2022)

1.4 Utilizzo di LAB omofermentanti ed eterofermentanti come starter

Gli additivi microbici (colture starter o inoculanti) sono i più utilizzati nella produzione di insilati. Si tratta di un prodotto costituito da ceppi di microorganismi appartenenti ad una sola specie o di microorganismi di specie diverse che devono essere vitali nel momento in cui vengono utilizzati (Carvalho et al., 2020). L'obiettivo principale per cui si utilizzano colture starter di LAB è il miglioramento della qualità e della conservazione del prodotto; I LAB sono le principali specie responsabili della riduzione del pH, e valori bassi di pH sono importanti sia per ridurre l'attività enzimatica vegetale, sia per ridurre lo sviluppo di microorganismi anaerobi indesiderati, come ad esempio i clostridi (Muck et al., 2007). L'utilizzo di colture starter di batteri LAB omofermentanti è tra i più antichi e comuni nella produzione di insilati (Muck et al., 2018) perché sono i produttori più efficienti di acido lattico producendone più del 85% a partire dagli esosi (Günter et al., 2003). Le principali specie di LAB omofermentanti utilizzate negli insilati sono: *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* (Carvalho et al. 2020). Il trattamento con queste tipologie di inoculi ha permesso di ottenere insilati con valori più bassi di pH, di acido acetico e butirrico, e di N-ammoniaca e valori più elevati di acido lattico e un maggior recupero di sostanza secca (DM) rispetto ai non trattati (Muck et al., 2018). È stato inoltre dimostrato come l'utilizzo di inoculi di LAB omofermentanti negli insilati destinati all'alimentazione di bovine da latte abbia incrementato la produzione di latte (Muck et al. 2018). Generalmente tale gruppo di LAB viene utilizzato per intensificare ed accelerare l'abbassamento del pH, mentre i LAB eterofermentanti obbligati, primo fra tutti *Lentilactobacillus buchneri* sono utilizzati negli insilati che presentano problemi associati al deterioramento aerobico (Carvalho et al., 2020). I LAB eterofermentativi come detto, sono utilizzati principalmente per migliorare la stabilità aerobica, poiché la produzione di acido acetico e propionico ha un effetto antifungino (Krooneman et al., 2002, Muck et al., 2018). Tra questi, *Lentilactobacillus buchneri* è la specie principalmente utilizzata come inoculante; converte l'acido lattico in acido acetico e 1,2-propandiolo che può essere convertito in acido propionico, dopo un periodo di conservazione (circa 30-60 giorni), migliorando la stabilità aerobica (Carvalho et al., 2020).

1.5 Caratterizzazione molecolare dei microorganismi

1.5.1 Metodi coltura-dipendenti e sequenziamento Sanger

I metodi coltura-dipendenti si basano sull'utilizzo dei terreni di crescita tradizionali che consentono la crescita del target da studiare e ciò può essere combinato ad analisi fenotipiche o genotipiche. Tuttavia è importante sottolineare che i metodi coltura-dipendenti hanno diversi limiti e spesso non riescono a caratterizzare microrganismi per i quali è necessario un arricchimento selettivo così come le cellule stressate o indebolite che hanno spesso bisogno di condizioni di coltura specifiche per diventare coltivabili (*Justé et al., 2008*). I metodi coltura-dipendenti possono essere associati al sequenziamento Sanger attraverso cui le colonie isolate vengono sequenziate per un gene target specifico, 16S rRNA nel caso dei procarioti e ITS 1 e ITS 2 (Internal transcribed space) nel caso degli eucarioti. In questo modo si arriva all'identificazione della specie. Il sequenziamento Sanger è un metodo di sequenziamento di prima generazione sviluppato da Sanger (*Sanger et al., 1977*). I metodi moderni di sequenziamento Sanger automatizzati prevedono l'utilizzo di di-deossiribonucleotidi con fluorocromi differenti che consentono di ricostruire l'intera sequenza. La tecnologia di sequenziamento Sanger è però in grado di sequenziare un singolo gene da un singolo campione mentre il sequenziamento massivo (NGS) permette di sequenziare separatamente le singole molecole di DNA (*Kircher et al., 2010*). Il sequenziamento Sanger consente però di ottenere sequenze di lunghezza compresa tra 600 e 1.000 pb (*Kircher et al., 2010*) e questo fornisce maggiori informazioni che consentono l'identificazione della specie.

1.5.2 Approcci coltura-indipendente e Next Generation Sequencing (NGS)

I progressi nelle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), in termini di produttività, riduzione dei costi e accuratezza, hanno avuto un grande impatto nello studio e caratterizzazione dell'ecologia microbica di diversi ambienti. Queste tecnologie superano quelle di sequenziamento Sanger di un fattore compreso tra 100 e 1000 in termini di produttività giornaliera e allo stesso tempo riducono il costo del sequenziamento di un milione di nucleotidi (1Mb) al 4%-0,1% di quello associato al sequenziamento Sanger (*Kircher et al., 2010*). Questo è uno dei maggiori vantaggi delle tecnologie NGS rispetto al sequenziamento Sanger ma tra gli svantaggi oltre all'ottenimento di reads mediamente di dimensioni inferiori, vi è che le tecnologie NGS hanno un tasso di errore medio notevolmente superiore a quello che si ha nel sequenziamento Sanger (*Kircher et al., 2010*). Una tra le piattaforme più utilizzate per il sequenziamento NGS è Illumina®

Miseq. Essa è una potente piattaforma di sequenziamento per la caratterizzazione rapida e ad alto rendimento della composizione di comunità microbiche mediante il sequenziamento di ampliconi del gene 16S rRNA (Fadrosh et al., 2014). La piattaforma Miseq consente di adottare protocolli di lettura paired-end da 250 bp e 300 bp e si basa sull'amplificazione clonale mediante bridge PCR sulla superficie della flow-cell e il sequenziamento avviene mediante sintesi (SBS). Nella figura 4 viene raffigurato lo schema generale della preparazione delle librerie e del sequenziamento nelle piattaforme Illumina.

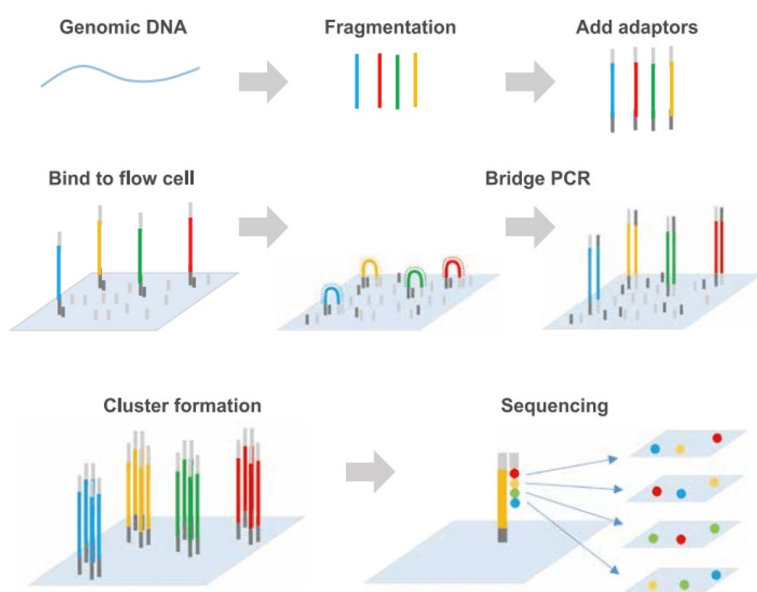


Figura 4. Schema di rappresentazione delle fasi del sequenziamento con piattaforma Illumina dall'amplificazione clonale alla rilevazione della fluorescenza dei nucleotidi nel sequenziamento by sintesi. (Fonte web)

Gli studi di comunità microbiche si possono basare sullo studio della filogenesi dei microorganismi utilizzando le regioni 16S rRNA o 18S rRNA/internal transcribed spacer (ITS) per la classificazione delle popolazioni batteriche e fungine, rispettivamente e quindi prevedono l'utilizzo di geni marcatori (Metabarcoding) o possono basarsi sulla metagenomica di interi shotgun genomici (McAllister et al., 2018). Il termine "metagenomica" è stato proposto per la prima volta con l'intento di indicare gli studi che analizzano i genomi collettivi recuperati direttamente dai campioni ambientali pertanto può essere definito come lo studio del

microbioma con tecniche coltura-indipendenti basate sul sequenziamento e l'isolamento del DNA di un'intera comunità microbica. Il "metabarcoding" è invece l'identificazione della composizione tassonomica di una comunità a partire da campioni ambientali attraverso l'amplificazione e il sequenziamento high-throughput dei geni marker (*Semenov, 2021*). In questo senso entrambi gli approcci discussi, coltura dipendente e coltura indipendente si differenziano dall'approccio di metagenomica poiché utilizzano un gene marcatore amplificandone una porzione più o meno estesa; mentre il primo approccio dipendente dai metodi colturali basato sul sequenziamento Sanger di una regione target può essere definito DNA-barcoding, il secondo basato sullo studio della comunità microbica mediante tecniche NGS indipendenti dalla coltura può essere definito DNA-metabarcoding.

1.5.3 DNA Metabarcoding per lo studio di comunità batteriche

Il DNA metabarcoding anche detto metagenetica o analisi dei geni marcatori consente l'identificazione tassonomica della comunità microbica a partire dal loro ambiente naturale attraverso l'amplificazione e il sequenziamento high-throughput (NGS) dei geni marker (*Barcode*) come il gene rRNA 16 S nei procarioti (*Semenov, 2021*). IL DNA metabarcoding consente la classificazione tassonomica e filogenetica dei microorganismi in ecosistemi complessi e grazie all'amplificazione specifica di regioni conservate non vi è il rischio di contaminazione ad esempio con il DNA dell'ospite. Tuttavia la selezione dei primers può creare distorsioni verso alcuni specifici membri della comunità microbica e inoltre la risoluzione è spesso insufficiente per l'identificazione non solo del ceppo ma spesso anche della specie (*McAllister et al., 2018*). Le sequenze dei geni 16S rRNA sono state utilizzate per la prima volta a metà degli anni '80 per l'analisi filogenetica e da quel momento sono divenuti il marcatore tassonomico più utilizzato (*McAllister et al., 2018*). I geni 16S rRNA generalmente contengono 9 regioni ipervariabili (V1-V9) le quali sono intervallate da sequenze conservate (figura 5). Le 9 regioni ipervariabili presentano un'elevata variabilità interspecifica e possono quindi essere utilizzate per l'identificazione tassonomica della specie. Le regioni conservate che invece fiancheggiano quelle ipervariabili consentono l'amplificazione specifica attraverso l'impiego di primers universali. L'utilizzo dell'intero gene 16S rRNA (lungo circa 1.200pb) è considerato il gold-standard per un'identificazione tassonomica accurata ma tuttavia richiede maggiori costi rispetto a quelli richiesti per l'analisi di una singola regione variabile (*McAllister et al.,*

2018). Le strategie di sequenziamento che utilizzano la piattaforma NGS Illumina® Miseq hanno come target la regione ipervariabile V4 del gene 16S rRNA (Fadrosh et al., 2014).

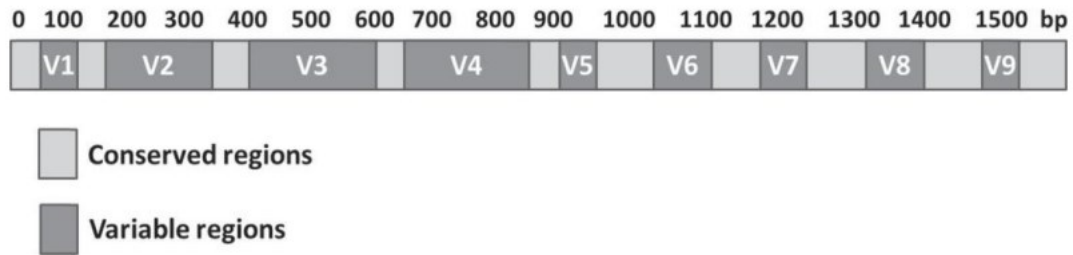


Figura 5. Struttura del gene rRNA 16S dei procarioti con le 9 regioni ipervariabili fiancheggiate dalle regioni conservate (McAllister et al., 2018)

2. Scopo della tesi

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di indagare, attraverso due approcci molecolari differenti, l'evoluzione della comunità microbica in insilati di cereali autunno-vernini inoculati con due differenti starter microbici: LAB (*Lactic Acid Bacteria*) eterofermentanti ed omofermentanti e sottoposti ad un processo sperimentale di insilamento di 60 giorni. Attraverso i due approcci, uno coltura-dipendente basato sull'isolamento delle colonie e sequenziamento Sanger del gene rRNA 16S e ITS1 e ITS e l'altro basato sul DNA metabarcoding del gene rRNA 16S con sequenziamento high-throughput si è indagato su come i due starter influenzassero l'evoluzione della comunità microbica dall'inizio alla fine della fermentazione e come tale comunità potesse influenzare le caratteristiche chimico-fisiche della massa insilata come il pH. Ci si è proposto di valutare anche in quale misura il contenuto di sostanza secca (DM) del materiale vegetale raccolto potesse influenzare l'evoluzione del processo sia in termini di comunità microbica e sia per quanto riguarda l'acidificazione del prodotto. L'utilizzo dei due differenti approcci molecolari consentirà di valutare i principali limiti e le principali risorse dell'uno e dell'altro consentendo di valutare l'eventuale complementarità dei due approcci.

3. Materiali e metodi

3.1 Inoculazione starter e raccolta campioni

I campioni di cereali autunno-vernini oggetto di questo lavoro sono stati raccolti a Giugno 2021 in tre Località del Veneto: Azienda P, Azienda A e Azienda Azienda M. I campioni sono stati trinciati e raccolti in tini per l'aggiunta dei due inoculi: Lattobacilli *omofermentanti* (KWS LACTOQUALITY) e Lattobacilli *eterofermentanti* (KWS LACTOSTABILITY) e il controllo (acqua) la cui composizione è riportata in tabella 1. Da notare come i nomi riportati sulle etichette dei due inoculi (tabella 3) non siano aggiornati con la nuova riorganizzazione tassonomica delle *Lactobacillaceae* ultimata da Zheng *et al.*, nel 2020 e quindi la nuova nomenclatura di *Lactobacillus plantarum* è *Lactiplantibacillus plantarum* e quella di *Lactobacillus buchneri* è *Lentilactobacillus buchneri*. *Pediococcus pentosaceus* ed *Enterococcus faecium* rimangono invariati. Gli inoculi di starter sono stati aggiunti seguendo la dose consigliata presente in etichetta e nello specifico 0,2016g di inoculo omofermentante su 90kg di trinciato e 0,1008g di inoculo omofermentante su 45kg di trinciato; per l'eterofermentante 0,432g di inoculo su 90kg e 0,216 di inoculo eterofermentante su 45kg di trinciato. Ciascuna dose di starter è stata diluita in 1L di acqua e i campioni subito dopo la trinciatura sono stati raccolti direttamente dal carro miscelatore e posti in tini per l'aggiunta degli inoculi (o del controllo) e la miscelazione (figura 6). Per ciascuna tesi saggiata sono state raccolte tre aliquote di ciascun campione per le analisi microbiologiche oggetto di questa tesi. Le tre aliquote (Controllo, Eterofermentante, Omofermentante) sono state raccolte in diversi tempi:

Tempo 0: sul campo dopo la trinciatura

Tempo 6: dopo sei giorni di insilamento

Tempo 60: dopo 60 giorni di insilamento

L'insilamento è avvenuto in bidoni da 20 L pressati con l'utilizzo di una pressa idraulica per creare le condizioni di anaerobiosi e posti in un locale adibito. I campioni sono stati raccolti utilizzando guanti sterili, posti in sacchi sottovuoto e trasportati in laboratorio.

	Composizione
<i>KWS LACTOQUALITY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • $7,2 \times 10^{10}$ UFC/g <i>Lactobacillus plantarum</i> (NCIMB 30083) • $1,4 \times 10^{10}$ UFC/g <i>Lactobacillus plantarum</i> (NCIMB 30084) • $7,2 \times 10^9$ UFC/g <i>Pediococcus pentosaceus</i> (DSM 23688) • $7,2 \times 10^9$ UFC/g <i>Pediococcus pentosaceus</i> (DSM 23689) • $4,3 \times 10^{10}$ UFC/g <i>Enterococcus faecium</i> (DSM 22502)
<i>KWS LACTOSTABILITY</i>	<ul style="list-style-type: none"> • $4,2 \times 10^{10}$ UFC/g <i>Lactobacillus buchneri</i> (CCM 1819)

Tabella 1 Specie riportate nelle etichette dei due inoculi utilizzati

3.2 Analisi Microbiologica

Subito la raccolta i campioni sono stati trasportati in laboratorio in condizioni di refrigerazione confezionati in sottovuoto all'interno di sacchetti sterili, in questo modo è stato possibile preservarne la stabilità microbiologica. In totale sono stati analizzati 81 campioni, (tabella S1 in allegato alla tesi) che includevano 3 aliquote di ciascun campione raccolto nelle 3 aziende nei 3 diversi tempi di insilamento studiati (T0, T6 e T60) Le analisi microbiologiche sono state eseguite su tre target microbici: *Lattobacilli*, microorganismi mesofili totali, muffe e lieviti. Per la preparazione dei campioni all'analisi microbiologica sono stati pesati 20g di ciascun campione e addizionati con 180ml di MRD (Maximum Recovery Diluent) accanto ad un becco Bunsen per mantenere l'ambiente sterile, secondo un rapporto 1:9. I campioni sono stati omogeneizzati con l'utilizzo di uno stomacher (BagMixer, Interscience) per 1 minuto. Dopo omogeneizzazione si è proceduto ad eseguire le opportune diluizioni seriali: 10 ml di omogenato sono stati inseriti nella prima provetta con concentrazione 1:10 e da qui 1 ml è stato aggiunto alle restanti provette contenenti 9 ml di brodo MRD. Oltre a questo, 2 ml della diluizione -1 sono stati trasferiti in *cryovials*, centrifugati alla velocità di 1000 rpm per 1 minuto e il surnatante è stato rimosso. I campioni sono stati stoccati a -80 °C per successive analisi.



Figura 6. Raccolta e miscelazione del trinciato dopo l'aggiunta dell'inoculo

3.2.1 Preparazione Terreni

Maximum Recovery Diluent

Le diluizioni seriali sono state eseguite utilizzando come liquido di diluizione MRD (Maximum Recovery Diluent) come definito dalla norma ISO 6887. Il Maximum Recovery Diluent è stato preparato utilizzando 1 g di peptone (Microbiol®) e 8.5 g di sodio cloruro (Microbiol®) a cui è stato aggiunto 1L di acqua distillata; è stato sterilizzato in autoclave a 121 °C per 15 minuti. La bassa concentrazione di peptone impedisce per qualche ora la moltiplicazione microbica proteggendo i microorganismi naturalmente presenti nel campione mentre il sodio cloruro permette il mantenimento di una pressione osmotica ottimale impedendo quindi il rischio di shock osmotico. Dopo aver eseguito le diluizioni seriali si è proceduto con la semina nei terreni specifici per i tre target microbici: *Lattobacilli*, microorganismi mesofili totali, muffe e lieviti.

Plate Count Agar (PCA)

Composizione Terreno PCA
2,5 g di estratto di lievito;
5 g di triptone (digerito pancreatico di caseina);
1 g di destrosio;
15 g di Agar-agar.

Tabella 2. Elenco dei componenti del terreno PCA

Il Plate Count Agar (Condalab) è un terreno solido non selettivo utilizzato per la conta aerobica totale. La formulazione del terreno è stata originariamente descritta da *Buchbinder et al.* nelle proporzioni sopra riportate. Questo terreno è utilizzato per la crescita di vari microorganismi e il tempo e la temperatura di incubazione dipendono dall' optimum di crescita dei microorganismi che si intende coltivare: aerobi, psicrofili, termofili e mesofili. In questo studio il target è rappresentato dai microorganismi mesofili per cui i terreni sono stati incubati alla temperatura di 32°C per 2 giorni. Dopo la sua preparazione e sterilizzazione in autoclave, il terreno è stato posto in bagnetto termostatico fino al raggiungimento della temperatura ambientale. Una volta raffreddato sono stati versati circa 10-15 ml di terreno in piastre Petri sterili sotto cappa biologica fino al suo raffreddamento e solidificazione.

Oxytetracycline Glucose Agar (O.G.A.)

Composizione Terreno OGA
Estratto di lievito 5 g/L
Glucosio 20 g/L
Agar batteriologico 15 g/L
Ossitetraciclina 0.1 g/

Tabella 3. Elenco dei componenti del terreno OGA

L' Oxytetracycline Glucose Agar (Condalab) è un terreno selettivo per la ricerca e il conteggio di muffe e lieviti. Questo terreno è utilizzato per l'isolamento selettivo di muffe e lieviti da prodotti alimentari. Grazie all'aggiunta dell'Oxitetraciclina immediatamente prima dell'uso viene inibita la crescita di gran parte di batteri compresi quelli acidofili. Tradizionalmente per l'isolamento di muffe e lieviti venivano impiegati Agar acidificati e in questo modo si sfruttavano i bassi livelli di pH per impedire la formazione di colonie batteriche e favorire, dunque, solo lo sviluppo di muffe e lieviti.

Micologi alimentari hanno però stabilito che terreni a pH acidi in realtà producono conteggi di lieviti inferiori rispetto ai terreni contenenti antibiotici (*Beuchat, 1993*) per cui l'utilizzo di antimicrobici ad ampio spettro risulta essere il metodo più efficace per l'isolamento selettivo di muffe e lieviti.

De Man, Rogosa e Sharpe MRS Agar

Composizione Terreno MRS
Peptone 10.00g/L
Estratto di carne 10.00 g/L
Estratto di lievito 5.00 g/L
Glucosio 20.00 g/L
Potassio fosfato 2.00 g/L
Sodio acetato 5.00 g/L
Diammonio citrato 2.0 g/L 0
Magnesio solfato 0.20 g/L
Manganese solfato 0.05 g/L
Tween 80 1.00 mL/L

Tabella 4 Elenco dei componenti del terreno MRS

Il terreno è stato descritto da DE MAN, J. C., ROGOSAM,. & SHARPEM,. E. (1960). ed è indicato per la coltivazione e l'isolamento di Lattobacilli da qualsiasi matrice. Questo terreno permette la crescita di ceppi particolarmente esigenti che difficilmente crescono in altri terreni (*Levilactobacillus brevis* *Limosilactobacillus fermentum*). All'MRS Agar abbiamo aggiunto 0.0125g/L di verde di Bromocresolo (J.T Baker) prima dell'aggiunta dell'acqua e della sterilizzazione del terreno. Il verde di Bromocresolo appartiene alla famiglia dei coloranti triarilmetanici ed è stato addizionato al MRS Agar come indicatore di pH allo scopo di ottenere una chiara differenziazione delle morfologie delle colonie anche in funzione della loro capacità acidificante e dunque del loro metabolismo fermentativo (omofermentanti ed eterofermentanti). Il verde di Bromocresolo ha un intervallo di viraggio compreso tra un valore di pH di 3.8 e 5.4. Al di sotto di 3.8 assume una colorazione gialla mentre al di sopra si presenta blu. Il verde di Bromocresolo è stato utilizzato in diversi studi e addizionato ad appositi terreni di coltura con l'obiettivo di discriminare le diverse colonie sulla base delle quantità di acidi prodotti: i batteri lattici omofermentanti producono più acido lattico a partire dal fruttosio

rispetto al gruppo degli eterofermentanti, in cui una parte del fruttosio è ridotta a mannitolo (Schillinger et. al., 2003).

3.2.2 Semina, isolamento e conta delle colonie

Dopo aver eseguito le diluizioni seriali i tre diversi terreni sono stati inoculati trasferendo 100µl di ciascuna diluizione, agitata tramite vortex per qualche secondo, in piastre Petri sterili; la semina è avvenuta per striscio utilizzando anse sterili per disperdere le cellule su tutta la superficie del terreno. Per i campioni del T0 sono state inoculate le diluizioni dalla -1 alla -7, per i campioni del T6 invece sono state inoculate le diluizioni dalla -3 alla -7 e per i campioni del T60 giorni invece si è inoculato partendo dalla diluizione -2 alla -8. Si è scelto di procedere in questo modo tendendo presente che per i campioni freschi non si conosceva il livello di carica microbica presente e quindi si è preferito mantenere un range di diluizioni più ampio. Per i campioni sottoposti invece ad un insilamento di 6 giorni sulla base dei risultati osservati al T0 e in virtù del fatto che poteva esserci una maggiore concentrazione di specie anaerobie e contestualmente una riduzione di quelle aerobie si è deciso di non inoculare le prime due diluizioni ma di inoculare invece quelle maggiormente diluite. Lo stesso è stato fatto per i campioni insilati per 60 giorni ma scegliendo un range ancora più ampio per essere sicuri di riuscire ad isolare le colonie qualunque sarebbe stata la densità. Dopo la semina i tre terreni sono stati incubati alle temperature e nelle condizioni più adatte alla crescita dei tre target:

- Plate Count Agar 32°C per 2 giorni
- De Man, Rogosa e Sharpe MRS Agar 32°C per 2 giorni in condizioni di anaereobiosi
- Oxytetracycline Glucose Agar 22°C per 5 giorni

Dopo il periodo di incubazione è stata eseguita la conta batterica di tutte le colonie visibili per tutte e tre le tipologie di terreni. Le piastre contenenti un numero compreso tra le 15 e le 300 colonie sono state quelle prese in considerazione per la stima dei microorganismi mesofili applicando la formula sottostante

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1 n_2)d}$$

$\sum C$ = somma delle colonie contate nelle diverse piastre alle due diluizioni prese in esame

V= volume dell'inoculo deposto nella piastra

n1 = numero di piastre contate alla diluizione più bassa

n2 = numero di piastre contate ali a diluizione più alta

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

I dati ottenuti sono stati riportati in LogUFC/g. Il valore del numero di colonie in ciascuna delle piastre considerate nella conta è stato registrato e per i campioni inoculati nei terreni MRS Agar e OGA, è stata eseguita una conta differenziale sulla base delle morfologie delle diverse colonie.

3.2.3 Selezione e stoccaggio colonie

Al termine del periodo di incubazione, i campioni del T0 del T6 e T60 isolati in MRS Agar e i campioni del T60 isolati in OGA sono stati sottoposti alla selezione delle colonie dalla morfologia tipica e ricorrente. Sono state descritte le caratteristiche morfologiche delle colonie selezionate e a ciascuna di esse è stato assegnato un numero progressivo identificativo della colonia e del campione da cui è stata isolata. Le colonie selezionate sono state quindi nuovamente isolate con semina individuale in MRSA e OGA al fine di ottenere la colonia pura ed eseguire l'estrazione del DNA. Inoltre, ogni colonia è stata stemperata in 1 ml di Maximum Recovery Diluent (MRD) contenente il 20% di glicerolo e stoccata a -20°C per l'estrazione del DNA e un'aliquota di essa stoccata a -80°C per la conservazione del ceppo puro (figura 7)

Colonie	Numero totale
Isolate da MRSA	227
Isolate da OGA	33
Starter isolati da MRSA	19

Tabella 5 numero totale delle colonie isolate



Figure 7 Colonie stemperate in 1 ml di MRD e glicerolo al 20 %

3.3 Analisi molecolari coltura-dipendente

3.3.1 Estrazione DNA da Lattobacilli

L'estrazione del DNA dei ceppi isolati da terreno MRS agar è avvenuta seguendo il protocollo di estrazione termica di seguito riportato

- Aggiungere 200 µl di acqua distillata ultra-pura in provette eppendorf
- Stemperare la colonia nell'eppendorf, mixare e vortexare per 10 secondi
- Aggiungere 5 µl di microlysis buffer (microLYSIS® PLUS Microzone) in strip e trasferivi 5 µl della sospensione della colonia
- Trasferire in termociclatore per l'estrazione del DNA secondo il seguente programma:
 - Step 1. 65 °C per 15 min.
 - Step 2. 96 °C per 2 min.
 - Step 3. 65 °C per 4 min.
 - Step 4. 96 °C per 1 min.
 - Step 5. 65 °C per 1 min
 - Step 6. 96 °C per 30 sec.
 - Step 7. 20 °C per 30 min

Al termine del programma i campioni sono stoccati a – 20 °C.

3.3.2 Estrazione DNA muffe e lieviti

Per l'estrazione di DNA in muffe e lieviti si è utilizzato il microlysis buffer (microLYSIS® PLUS Microzone) adottando degli accorgimenti differenti a quanto fatto per l'estrazione del DNA dai batteri lattici. Di seguito è riportato il protocollo di estrazione.

- Aggiungere 100 µl di acqua BDH in provette eppendorf da 500 µl
- Stemperare la colonia nella eppendorf e agitare tramite vortex per qualche minuto assicurandosi che la colonia sia ben sospesa e omogenata
- Aggiungere 10 µl di microlysis buffer (microLYSIS® PLUS Microzone) in strip e trasferivi 10 µl della sospensione della colonia
- Agitare tramite vortex per qualche minuto e trasferire le provette in termociclatore utilizzando lo stesso programma descritto per i batteri lattici

Al termine del programma i campioni sono stoccati a – 20 °C.

3.3.3 Amplificazione

Dopo l'estrazione del DNA i campioni di batteri lattici, muffe e lieviti sono stati sottoposti ad amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) in modo tale da amplificare selettivamente una specifica regione genomica da sottoporre successivamente a sequenziamento Sanger. La mix di PCR è stata allestita utilizzando i reagenti riportati nella tabella 6, per un volume finale di 20 μ l (17.5 μ l di master mix e 2.5 μ l di DNA).

<i>Reagenti</i>	<i>Quantità μl</i>
<i>BDH</i>	<i>14.1 μl</i>
<i>Buffer (10 X)</i>	<i>2 μl</i>
<i>dNTPs (25mM)</i>	<i>0.2 μl</i>
<i>Primer Forward</i>	<i>0.5 μl</i>
<i>Primer Reverse</i>	<i>0.5 μl</i>
<i>Dream Taq ThermoFisher (5U/μl)</i>	<i>0.2 μl</i>
<i>DNA</i>	<i>2.5 μl</i>

Tabella 6 Reagenti e relative quantità della master mix di PCR

Solitamente viene preparata un'unica mix di PCR in questo modo si riduce la variabilità tecnica legata al prelievo di differenti quantità di reagenti e inoltre questo consente di lavorare con volumi maggiori. Per l'amplificazione dei due diversi target (LAB, muffe e lieviti) sono state utilizzate differenti coppie di primer.

Primer specifici per l'rRNA 16S

Per la PCR dei batteri lattici si è amplificata una sequenza del gene 16S rRNA utilizzando la seguente coppia di primers universali: primer *forward* 8FLP con sequenza 5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (T-melting 53.7 °C) e primer reverse 806R con sequenza 5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3' (T-melting 55.3 °C). La seguente coppia di primers consente di ottenere ampliconi dalla lunghezza di circa 800 pb adatti per il sequenziamento Sanger. Come controllo positivo è stato utilizzato *Limosilactobacillus fermentum* CECT 4007. I campioni sono stati centrifugati alla velocità di 3000 rpm per 5 minuti e una volta preparate le strip la PCR viene eseguita seguendo il protocollo sotto riportato.

16S	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
inizializzazione	95°C	2'	1
denaturazione	95°C	20''	35
annealing	51°C	30''	
extention	72°C	45''	
elongazione	72°C	5'	1
cooling	16°C		

Tabella 7 Protocollo termico della PCR

Primer specifici per l'ITS1 e ITS2

Il DNA estratto da muffe e lieviti è stato amplificato con una coppia di primers che amplificano le regioni ITS1 e ITS2 (ITS, Internal Transcribed Spacers) del DNA ribosomiale (rRNA) utilizzando la seguente coppia di primers *forward* 18S_ITS1 F 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3' e *Reverse* 28S_ITS4 A 5'-CGC CGT TAC TGG GGC AAT CCC TG-3' (Larena et al., 1999). La PCR è stata eseguita seguendo il protocollo sotto riportato.

ITS1; ITS2	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
inizializzazione	94°C	10'	1
denaturazione	94°C	20''	40
annealing	58°C	30''	
extention	72°C	40''	
elongazione	72°C	10'	1

Tabella 8 Protocollo di PCR

3.3.4 Corsa elettroforetica su gel

Per la valutazione dei prodotti di amplificazione è stata eseguita la corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.5% al fine di rilevare la presenza della banda e quindi il buon esito della PCR end-point. Il gel di agarosio è stato preparato utilizzando 1.5g di agarosio a cui sono stati aggiunti 100 ml di tampone Tris-Acetato- EDTA (TAE). Il tutto è stato portato ad ebollizione, all'interno di una bottiglia in vetro dedicata, con l'utilizzo di un forno microonde fino alla completa scomparsa dei frammenti di agarosio e l'ottenimento di un liquido trasparente. Dopo il raffreddamento del gel è stato

aggiunto il SYBR® Safe DNA Gel Stain (1 µl ogni 10 ml di TAE) un intercalante che si lega agli acidi nucleici consentendo la visualizzazione degli amplificati. Il gel, una volta solidificato, è stato trasferito in apposita cella elettroforetica riempita con il tampone di corsa TAE. I campioni da sottoporre ad elettroforesi sono stati preparati aggiungendo a 5 µl di DNA amplificato 5 µl Loading Dye (2X) e aggiunti ad ogni pozzetto del gel (figura 8). Nel primo pozzetto del gel non è stato addizionato campione bensì 3 µl di DNA marker *Biolabs 100 bp*, una miscela di DNA a peso molecolare noto che ci consente di stimare il peso molecolare dei campioni di DNA. La corsa elettroforetica è avvenuta a 100 V, 400 mA e 100 W per circa 40 minuti. Al termine della corsa il risultato è stato visualizzato mediante transilluminatore Gel Doc XRTM (Biorad). Quello che è stato valutato per ciascun campione è la corretta presenza della banda, la sua dimensione ed intensità e l'eventuale presenza di *smering* che può dare informazioni sull'integrità dell'amplificato.



Figura 8. Campioni caricati sul gel prima della corsa

3.3.5 Purificazione e diluizione dei campioni

Dopo la separazione mediante elettroforesi è stata osservata la banda corrispondente a ciascun campione per valutare la qualità dell'amplificazione sia in termini di presenza o assenza della banda (nel caso, ad esempio, di un target diverso non amplificabile dai *primers* impiegati) e sia in termini di spessore della banda per procedere ai successivi step di purificazione e diluizione. La purificazione dei prodotti di PCR è stata eseguita con il kit EuroSAP PCR Enzymatic Clean-up specifico per la rimozione di dNTPs e primers non incorporati durante la reazione di PCR in modo che questi non

andranno ad interferire con la successiva fase di sequenziamento. Il kit è costituito da due enzimi l'*Exonuclease I* (Exo I) che degrada le sequenze di DNA a singolo filamento (*primers*) e la fosfatasi alcalina (SAP) che defosforila i nucleotidi. Dopo centrifugazione dei prodotti di PCR 5µl di questi vengono trasferiti in una nuova eppendorf e a ciascuno di essi vengono addizionati 1µl di SAP e 1µl Exo I. I campioni vengono poi trasferiti nel termociclatore utilizzando un programma di purificazione specifico che prevede 5 minuti a 37°C (optimum dei due enzimi) seguiti da 10 minuti a 80°C per arrestare la reazione enzimatica. L'ultimo step di preparazione dei campioni al sequenziamento Sanger prevede la diluizione di questi sulla base dell'intensità della banda elettroforetica confrontata con la banda del DNA marker (800pb). Questo step è necessario al fine di ottenere una concentrazione finale di DNA > 50 ng/µl richiesta dal centro di sequenziamento. A tale scopo i campioni sono stati classificati in 4 gruppi:

- 0X banda normale che non necessita di diluizioni → 5 µl di DNA
- 10X banda più intensa del normale da diluire di 10 volte → 2 µl di DNA + 18 µl acqua
- 20X banda più intensa del normale da diluire di 20 volte → 2 µl di DNA + 38 µl di acqua
- 40X banda più intensa del normale da diluire di 40 volte → 2 µl di DNA + 78 µl di acqua

Dopo le diluizioni 5 µl di primer *Forward* specifico per il target (8 FLP per il 16S e 18S per ITS1 e ITS 2) e 5 µl di DNA sono stati aggiunti in una piastra da 96 per il sequenziamento. La piastra pronta (figura 9) è stata spedita presso il centro di sequenziamento Macrogen (Sud Corea)

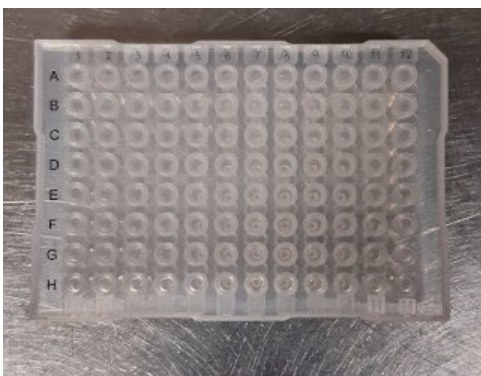


Figura 9. Piastra da 96 pronta per il sequenziamento

3.4 Analisi molecolari coltura-indipendente

Per lo studio delle comunità microbiche si è utilizzato un approccio di *Metabarcoding* il quale consente di studiare ed esplorare la biodiversità di un ambiente combinando l'analisi di un gene marcatore (16S rRNA nel caso dei procarioti) con le tecniche di sequenziamento massivo. In questo studio sono stati analizzati 81 campioni (Tabella S1 nei materiali supplementari) inoltre, sono state analizzate le comunità microbiche dei due starter utilizzati, *KWS Lactostability* e *KWS Lactoquality*.

3.4.1 Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dagli insalati per lo studio delle comunità microbiche è stata eseguita utilizzando il *DNeasy PowerSoil Pro kit* della ditta QIAGEN. Per l'estrazione del DNA sono stati prelevati 2 ml della diluizione -1 utilizzata per le diluizioni seriali, trasferiti in cryovials e centrifugati alla velocità di 1000 rpm per 1 minuto, il surnatante è stato rimosso. Si è seguito il protocollo *DNeasy PowerSoil Pro kit* e quindi 250 mg di campione e 800 µl di soluzione CD1 fornita dal kit sono stati aggiunti nella provetta *PowerBead Pro Tubes* contenente biglie di varie dimensioni e un buffer di lisi che facilita la dispersione delle particelle del campione e protegge gli acidi nucleici dalla degradazione. La lisi dei campioni è avvenuta utilizzando il *TissueLyser II* (QIAGEN) 2 volte per 1 min alla frequenza di 30 Hz; la lisi meccanica è avvenuta all'interno di blocchi ghiacciati per evitare il surriscaldamento e la degradazione del DNA e al termine del minuto le provette sono state poste per alcuni secondi in ghiaccio. Al termine della lisi i campioni sono stati centrifugati per 1 min. a 15.000 rcf e 550 µl di surnatante sono stati trasferiti all'interno di *2 ml Microcentrifuge Tube* fornite dal kit. Al surnatante sono stati aggiunti 200 µl di soluzione CD2 agitati tramite vortex per 5 s e centrifugati a T ambiente per 1 min a 15 000 rfc. Delicatamente, per evitare il trasferimento del pellet, 600 µl del surnatante sono stati trasferiti all'interno di nuove *2 ml Microcentrifuge Tube* fornite dal kit alle quali sono stati aggiunti 600 µl di soluzione CD3 e agitati tramite vortex per 5 s. Da tale soluzione lisata 650 µl sono stati trasferiti all'interno di provette contenenti una colonnina *MB Spin Column* e centrifugate per 1 min. a 15,000 rcf; al termine il filtrato è stato eliminato. Questa procedura è stata ripetuta fino a quando tutto il lisato contenuto nelle *2 ml Microcentrifuge Tube* non fosse terminato. A questo punto il protocollo prevede di collocare la colonnina *MB Spin*, delicatamente ed evitando qualsiasi tipo di contaminazione, all'interno di una nuova *2 ml Microcentrifuge Tube* e aggiungere 500 µl di soluzione EA all'interno della colonnina; centrifugare

per 1 min. a 15,000 rcf scartare il filtrato raccolto nella provetta e inserire la colonnina nella stessa *2 ml Microcentrifuge Tube*. Aggiungere 500 μ l di soluzione C5 sulla colonnina *MB Spin Column* centrifugare per 1 min a 15,000 rcf e scartare il filtrato e porre la colonnina all'interno di una nuova *2 ml Microcentrifuge Tube*. Centrifugare per 2 min a 16,000 rcf e porre delicatamente la colonnina *MB Spin Column* all'interno di un nuovo *1.5 ml Elution Tube* fornito anch'esso dal kit e aggiungere 70 μ l di soluzione C6 al centro della membrana filtro per l'eluizione del DNA dalla colonnina e centrifugati per 1 min. a 15,000 rcf. Al termine della procedura la colonnina è stata scartata e il DNA estratto è stato stoccato a -20°C.

3.4.2 Valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto

Dopo l'estrazione del DNA è stata eseguita una valutazione a livello qualitativo e quantitativo del DNA estratto sia con l'utilizzo del Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) che mediante elettroforesi in gel di agarosio. Il Nanodrop è uno spettrofotometro che consente la quantificazione delle molecole di DNA impiegando solo 1–2 μ l di campione sfruttando la tensione superficiale dei liquidi che si viene a creare quando un volume ridotto si trova tra due superfici vicine. Lo strumento riconsegna la concentrazione finale di DNA in ng/ μ L e i rapporti di assorbanza 260/280 nm e 260/230 nm che ci danno informazioni sulla qualità del DNA e sul livello di contaminazione da proteine e agenti organici o caotropici, rispettivamente. Se questi due rapporti sono >1.8 indicano una buona purezza dell'estratto. Il Nanodrop non è però in grado di differenziare DNA integro e DNA degradato a tal proposito è stata eseguita la valutazione dell'integrità del DNA estratto mediante corsa elettroforetica. Il gel è stato preparato come descritto nella parte relativa alla corsa elettroforetica dei prodotti di PCR utilizzando in questo caso una concentrazione di agarosio all' 1% e ad ogni pozzetto del gel sono stati addizionati 5 μ L di estratto e 5 μ L di Loading Dye (2X). La corsa è avvenuta per un tempo variabile in base alla dimensione del gel a 120 V e al termine della corsa il risultato è stato visualizzato mediante transilluminatore Gel Doc XRTM (Biorad). In questo modo è stato possibile stimare il livello di integrità del DNA estratto e il peso molecolare.

3.5 Preparazione delle librerie dell'amplicone 16S per sequenziamento NGS

La preparazione delle librerie dell'amplicone 16S per lo studio delle comunità microbiche è avvenuta attraverso 2 step di PCR ciascuno dei quali è stato seguito da purificazione e corsa elettroforetica in

gel di agarosio per verificarne la corretta esecuzione. Nello studio delle comunità microbiche è stata amplificata una porzione del gene 16S di circa 470 pb, più piccola rispetto alla porzione amplificata per l'identificazione di specie tramite sequenziamento Sanger che era di circa 800 pb.

3.5.1 Primo step di PCR

Il primo step di PCR è stato eseguito con le seguenti coppie di primers:

Forward 16S_F_Illumina CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC TTC CTA CGG GAG GCA GCA GT

Reverse 16S_R_Illumina CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TGG ACT ACC AGG GTA TCTAAT CCT

contenenti una porzione in grado di legarsi ad una regione conservata del gene 16S rRNA dei batteri presenti nella matrice e una porzione in grado da fungere da adattatore per i primers del secondo step di PCR. Nella tabella 9 è riportato il volume dei singoli componenti della mix impiegata in questo primo step di amplificazione.

Reagenti	Quantità 1X	Quantità 3X
Buffer 5XHF	4 µL	12 µL
dNTP's (25 mM)	0,2 µL	0,6 µL
<i>Primer</i> 16S_F_Illumina	0,5 µL	1,5 µL
<i>Primer</i> 16S_R_Illumina	0,5 µL	1,5 µL
<i>Taq</i> Fusion HF	0,5 µL	1,5 µL
H2O	9,3 µL	27,9 µL
DNA	5 µL	15 µL
Totale	20 µL	60 µL

Tabella 9 Mix di reazione del primo step di PCR

L'amplificazione è stata eseguita per ciascun campione in triplicato in modo da riuscire ad amplificare anche le sequenze meno rappresentate all'interno dei campioni e ridurre il più possibile gli errori commessi dalla Taq polimerasi legati all'inclusione di nucleotidi errati: 60 µL di mix sono stati suddivisi equamente in 3 pozzetti differenti. La piastra è stata poi centrifugata per l'eliminazione di eventuali bolle presenti a 3000 rpm per qualche secondo. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando il seguente programma riportato nella tabella 10 per un totale di 25 cicli

2 minuti	94 °C
30 secondi	94 °C
30 secondi	94 °C
45 secondi	72 °C
7 minuti	72°C

Tabella 10 Protocollo termico primo step di PCR

Per la valutazione qualitativa del processo di amplificazione i triplicati di ciascun campione sono stati tra di loro riuniti in un unico pool e sottoposti a corsa elettroforetica in gel di agarosio. La preparazione del gel è stata eseguita come descritto nelle sezioni precedenti con una concentrazione di agarosio dell'1.8%. L'amplicone atteso ha una lunghezza di poco inferiore a 500 pb quindi è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare 100 bp. La corsa elettroforetica è avvenuta a 120 V per un tempo di 30-40 minuti e al termine della corsa il risultato è stato visualizzato mediante transilluminatore Gel Doc XRTM (Biorad). Quello che è stato valutato per ciascun campione è stata la corretta presenza e posizione della banda, la sua intensità e l'eventuale presenza di *smering*.

3.5.2 Purificazione dei prodotti di PCR

Una volta valutata la qualità degli ampliconi si è proceduto con la purificazione in modo tale da rimuovere dNTPs in eccesso, frammenti di primer e la Taq Fusion e mantenere solamente le molecole di DNA a doppio filamento che hanno una precisa dimensione. A tal proposito è stato utilizzato il kit *SPRIselect reagent Kit (Beckman Coulter Genomics)* basato sull'utilizzo di biglie magnetiche che legano in maniera selettiva le molecole di DNA a doppio filamento (lo schema riassuntivo della metodica è riportato in figura 10. La concentrazione delle biglie da utilizzare viene scelta in base alla lunghezza degli ampliconi da purificare, in questo caso è stata utilizzata una concentrazione di biglie 0,8X (pb) che consente di trattenere ampliconi che hanno una lunghezza compresa tra 200 e 2000 pb. Il protocollo di purificazione schematizzato nella figura 5 fornita dalla guida del kit prevede di aggiungere le biglie alla concentrazione di 0.8X (pb) ai pozzetti di una piastra BIORAD ai quali aggiungere tutto il volume di amplificato disponibile, in questo caso verranno aggiunti poco meno di 55 µl considerando che 5 µl sono stati utilizzati per la corsa elettroforetica e che possono esserci state perdite legate all'evaporazione del campione durante la PCR.

Left Side Size Selection Process Overview

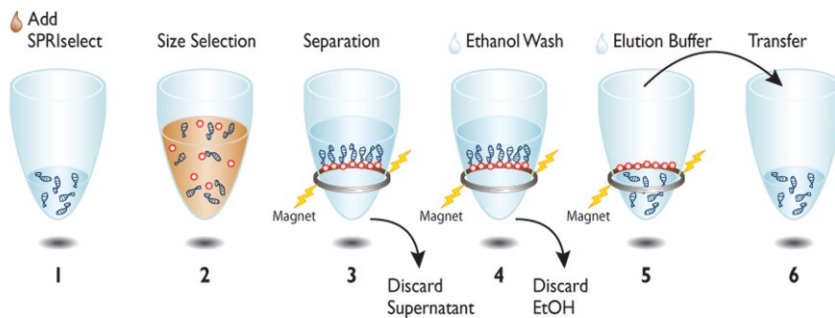


Figura 10. Schema riassuntivo del protocollo SPRIselect

Nel momento in cui il campione viene aggiunto ai pozzetti contenenti le biglie è molto importante mescolare bene con movimenti up and down della pipetta per facilitare il legame tra le biglie e gli ampliconi; per aumentare l'efficienza del legame, inoltre, la sospensione viene posta ad agitare a temperatura ambiente per pochi minuti. A questo punto la piastra viene trasferita su un supporto magnetico attraverso il quale le biglie e, dunque gli ampliconi, saranno attratte verso il bordo mentre il surnatante, rappresentato dai dNTPs, i dimeri di primer e la Taq Phusion sarà al centro del pozzetto e verrà scartato. Le biglie sono quindi lavate con 180 μL di etanolo all'85% a temperatura ambiente per 30 secondi in modo da purificare ulteriormente le molecole di DNA da possibili contaminazioni residue. Trascorsi i 30 secondi, mantenendo sempre le biglie a contatto con il magnete, l'etanolo viene aspirato e scartato e si consente l'evaporazione dei residui di etanolo; in quest'ultima fase è molto importante che le biglie non si seccino eccessivamente in quanto questo può causarne la rottura e la perdita degli ampliconi. Si procede con la fase di eluizione degli ampliconi dalle biglie, la piastra viene tolta dal supporto magnetico e vengono aggiunti 52,5 μL di acqua BDH sfruttando la sua maggiore affinità per il DNA rispetto alle biglie; è necessario agitare abbondantemente la sospensione con la pipetta in modo da massimizzare il distacco. A questo punto la piastra viene nuovamente posta sul supporto magnetico ciò consente l'allontanamento delle biglie e il trasferimento di 48 μL di surnatante in una nuova piastra. Al termine del processo di purificazione viene eseguita una valutazione qualitativa del processo di purificazione mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1,8% in modo da verificare che si siano selezionati gli ampliconi dalla corretta dimensione (poco meno di 500 pb) e che non vi siano contaminazioni.

3.5.3 Secondo step di PCR

Nel secondo step di PCR sono impiegate due coppie di primer (Tabella 11). Tra queste coppie di primers una è stata addizionata in concentrazioni minori e serve per il legame con gli adattatori aggiunti durante il primo step di PCR. La seconda coppia contiene al suo interno le regioni che consentono il sequenziamento *Illumina*, quali le sequenze che legano gli oligonucleotidi presenti sulla flow cell e le sequenze che saranno riconosciute dai primers di sequenziamento. Oltre a queste regioni uno dei primers presenta una regione *Barcode*, ovvero 7 nucleotidi che differiscono per ogni campione e che distingueranno in maniera univoca ogni campione dopo la generazione del *pool* della libreria e nella fase di *demultiplexing*

2bRAD_ampl_F	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA
2bRAD_ampl_R	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA
2bRAD_F	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T
2bRAD_BC...	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATcatcttGTGACTGGAGTTCAGAC GTGTGCTCTTCCGATC

Tabella 11 Primers utilizzati nel secondo step di PCR

Nella tabella 12 sottostante è riportata la composizione della mix di PCR, anche in questo secondo step ciascun campione è stato eseguito in triplicato

Reagenti	Quantità 3X
Buffer 5XHF	10 µL
dNTP's (25 mM)	0,625 µL
2bRAD_ampl_F	1 µL
2bRAD_ampl_R	1 µL
2bRAD_F	2,5 µL
2bRAD_BC..	2,5 µL
Taq Fusion HF	1 µL
H2O BDH	26,375 µL
DNA	5 µL
Totale	50 µL

Tabella 12 Composizione della mix del secondo step di PCR

Il volume finale di 50 μ L è stato suddiviso equamente in 3 distinti pozzetti per consentire di eseguire i triplicati e. La piastra è stata poi centrifugata per l'eliminazione di eventuali bolle presenti a 3000 rpm per qualche secondo. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando il seguente programma riportato nella tabella 13 per un totale di 10 cicli

3 minuti	95 °C
30 secondi	98 °C
30 secondi	60 °C
45 secondi	72 °C
5 minuti	72°C

Tabella 13 Protocollo termico del secondo step di PCR

Al termine dell'amplificazione le quantità dei tre pozzetti sono state riunite in unico pool sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.8% per valutare la buona riuscita dell'amplificazione. In questo caso la dimensione attesa dell'amplicone è aumentata a circa 620 pb considerando la lunghezza dei primers ed è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare 1200bp. Al termine della corsa il risultato è stato visualizzato mediante transilluminatore Gel Doc XRTM (Biorad). Quello che è stato verificato è stata la presenza di un'unica banda della dimensione corretta (altezza corretta nel gel).

3.5.4 Purificazione dei prodotti di PCR

Anche in questo caso la purificazione è stata eseguita seguendo il protocollo kit *SPRIselect reagent Kit* come nel caso del primo step di PCR; le uniche differenze rispetto al protocollo sopra riportato riguardano la concentrazione di acqua utilizzata nella fase finale di eluizione degli ampliconi dalle biglie, in questo caso sono stati utilizzati 27,5 μ L di acqua. Il volume finale di DNA purificato, prelevato e trasferito in una nuova piastra è stato in questo caso di 25 μ L. Al termine del processo di purificazione, esattamente come nel caso del primo step di PCR è stata eseguita la corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.8% per verificare la corretta purificazione e che le bande siano della lunghezza attesa.

3.5.5 Quantificazione con metodo fluorimetrico e pooling della libreria

I campioni che vengono inviati al centro di sequenziamento sono contenuti tutti all'interno di un'unica provetta alla medesima concentrazione. Il pool deve quindi essere equimolare e questo è di fondamentale importanza perché se così non fosse un campione presente ad una maggiore concentrazione sarebbe favorito durante il sequenziamento massivo con piattaforma NGS. Per la creazione del pool equimolare bisogna eseguire prima una quantificazione di ciascun campione in modo tale da decidere quale volume di esso prelevare; la quantificazione viene fatta utilizzando un metodo fluorimetrico. A tale proposito è stato utilizzato il kit *Qubit Assay Kit BR* (Invitrogen, Life technologies) ma la rilevazione della fluorescenza non è avvenuta attraverso il fluorimetro Qubit bensì utilizzando lo strumento della *real-time PCR* (Stratagene Mx3000P dell'Agilent Technologies) attraverso una lettura end-point. Si è scelto di utilizzare questa strumentazione poiché permette di analizzare contemporaneamente la concentrazione molare di 96 campioni e impiega un volume minore di campione rispetto al Qubit in cui la quantificazione avviene singolarmente. Il *Qubit Assay Kit BR* contiene il fluoroforo *fluorescent dyes* il quale si lega esclusivamente a DNA integro intercalandosi alla doppia elica ed emettendo fluorescenza a maggiore intensità rispetto a quella emessa quando non legato. Oltre al fluoroforo il kit fornisce il buffer e due standard di DNA a concentrazione nota attraverso i quali viene costruita la retta di taratura necessaria per quantificare i campioni ignoti. La retta di taratura viene creata eseguendo 9 diluizioni seriali a partire dallo Standard 2 che ha una concentrazione di DNA di 100 ng/μL mentre nell'ultima provetta viene inserito lo standard 1 che ha una concentrazione di DNA di 0 ng/μL. La lettura della fluorescenze degli standard a concentrazione nota ha permesso di ottenere una retta che consente di conoscere la concentrazione dei campioni. La mix di reazione è costituita dal fluoroforo e dal buffer nelle proporzioni 1:200 ed è stata preparata aggiungendo 1 μL di fluoroforo ogni 200 μL di volume di soluzione finale tenendo conto del fatto che il volume di DNA da aggiungere ad ogni pozzetto è di 1 μL. Preparata la mix nella piastra apposita per la PCR *real-time* in ogni pozzetto sono stati inseriti:

- 1 μL di campione o di standard
- 19 μL di mix

Per evitare la degradazione dei fluorofori in seguito al contatto con la luce è bene inserire la mix contenente i fluorofori alla fine e proteggere la piastra ricoprendola con carta d'alluminio. La piastra è stata agitata tramite vortex per due minuti e centrifugata tramite per 2 min a 3000 rpm e posta

nello strumento della *real-time* per la lettura della fluorescenza. Dopo la lettura della concentrazione sono stati calcolati i volumi di ciascun campione da aggiungere ad un'unica provetta per l'ottenimento di un pool equimolare. Successivamente ogni campione è stato aggiunto singolarmente alla provetta e il pool finale quantificato; infine è stata calcolata la concentrazione del *pool* (ng/ μ L) e la molarità (nM)

3.5.6 Valutazione quantitativa del pool della libreria

Una volta creato il pool della libreria lo si deve quantificare con metodo fluorimetrico per verificare che la concentrazione finale fosse quella attesa e ottenerne la concentrazione esatta. La quantificazione del viene eseguita attraverso il *Qubit Assay Kit HS (BR)* (*Invitrogen, Life technologies*) utilizzando questa volta il fluorimetro *Qubit* (*Invitrogen, Life technologies*). La mix è stata preparata utilizzando 199 μ L di buffer e 1 μ L di fluoroforo, nel caso degli standard sono stati utilizzati 10 μ L di standard e 190 μ L di mix; per la libreria invece sono stati utilizzati 2 μ L di DNA e 198 μ L di mix. Prima di eseguire la quantificazione è necessario calibrare lo strumento con i due standard: standard 1 (0 ng/ μ L) e standard 2 (100 ng/ μ L) attraverso cui lo strumento crea una curva di calibrazione e successivamente si procede alla lettura della libreria. Lo strumento restituirà la concentrazione ng/ μ L della libreria.

3.5.7 Valutazione qualitativa del pool della libreria

Per la valutazione qualitativa del pool della libreria è stato utilizzato il *2100 Bioanalyzer* (*Agilent Technologies*), il principio di questa analisi è quello dell'elettroforesi la quale avviene a livello di microchip con minore spreco di tempo, reagenti e campioni. Il *Bioanalyzer* permette l'esecuzione di un'elettroforesi microcapillare più precisa di quella eseguita in gel di agarosio sfruttando il medesimo principio: i campioni migrano all'interno di una matrice (gel) e vengono separati in base al loro peso molecolare. Il chip utilizzato è costituito da una serie di pozzetti tra di loro collegati da microcanali, ciascuno dei quali è destinato al caricamento di uno specifico componente: *Gel-Dye Mix*, 5 μ L di *Marker*, 1 μ L di *Ladder* e 1 μ L di DNA. Dopo aver caricato tutti i componenti il chip è stato agitato tramite vortex per un minuto e successivamente inserito nel *Bioanalyzer* per la corsa e la valutazione qualitativa dei vari frammenti. Durante tutta l'analisi è necessario limitare il più possibile l'esposizione alla luce dei reagenti, pertanto, si è utilizzata carta d'alluminio per ricoprire il chip e i reagenti nel corso dell'analisi. Al termine delle valutazioni quantitative e qualitative 200

μL del pool sono stati trasferiti in una nuova provetta e spediti al centro di sequenziamento *UCDAVIS Genome Center (California)* in cui è stato eseguito il sequenziamento *pair-end* (300 pb) attraverso la piattaforma *Miseq System*, Illumina®.

3.6 Analisi chimiche, microbiche e del sequenziamento Sanger

3.6.1 Analisi chimiche ed elaborazioni statistiche della conta microbica

Le analisi chimiche di tutti i campioni utilizzati in questo lavoro, nei vari tempi e tesi studiate, sono state condotte presso un altro laboratorio con l'impiego della strumentazione NIR FOSS DS 2500. I risultati relativi alla concentrazione di sostanza secca (DM) hanno consentito la suddivisione di questi in 3 categorie sulla base del contenuto di DM (alta, media e bassa) insieme ai valori di pH per i campioni del T6 e T60, sono stati qui utilizzati e correlati ai risultati ottenuti e saranno mostrati nei paragrafi dedicati. Il test di combinazione non parametrico (NPC) è stato condotto con il software gratuito NPC Test R10 (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/pesarin/material.html>). I valori di p-value parziali e globali sono stati determinati per i profili di conteggio microbico (\log_{10} CFU/g) considerando tre repliche per ciascuna tesi (Controllo, Eterofermentativa, Omofermentativa) e agli effetti del tempo di conservazione (T0, T6, T60). I confronti sono anche stati eseguiti attraverso una procedura di stratificazione in base al fattore sostanza secca (DM): DM1 riferita ai campioni dell'azienda P, DM2 riferita ai campioni dell'azienda A e DM3 per i campioni dell'azienda M

3.6.2 Analisi delle sequenze Sanger

Il centro di sequenziamento Magrogen ha restituito i cromatogrammi relativi alle sequenze di ciascun campione, i quali sono stati visualizzati attraverso il programma FinchTV 1.4.0. Ciascun cromatogramma è stato controllato singolarmente per verificare che la chiamata delle basi corrispondesse al colore del picco corrispondente e sono state eliminate le aree illeggibili del cromatogramma, come i siti di legame del primer e quelle aree con eccessivo rumore di fondo. Una volta completata la correzione del cromatogramma, la sequenza è stata incollata in un file di testo, convertita in formato FASTA ed è stato eseguito un allineamento locale utilizzando il *nucleotide BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ciascuna sequenza del gene rRNA 16 S (nel caso dei batteri lattici) e ITS 1 e 2 (nel caso

dei funghi) è stata confrontata con le sequenze presenti nel database di GenBank per l'identificazione di specie. Una volta eseguito il BLAST per ciascuna sequenza di ogni campione è stata selezionata la specie con la percentuale di identità più vicina al 100% e tutte le sequenze identificate sono state riportate in un file di testo in formato FASTA per le successive analisi.

3.6.3 Allineamenti globali e analisi filogenetica

È stato utilizzato il software Mega versione 6.0 per allineare le sequenze e condurre l'analisi filogenetica. Le sequenze dei campioni di ciascuno dei tre diversi tempi di insilamento considerati sono state tra loro allineate all'interno di MEGA attraverso il *tool di multiple alignment CLUSTAL W*. Una volta creato l'allineamento e salvato in formato MEGA è stata condotta l'analisi filogenetica e sono stati costruiti gli alberi filogenetici di Maximum Likelihood dei tre diversi tempi studiati per visualizzare e indagare le relazioni filogenetiche tra le diverse specie. Una volta creati in MEGA, gli alberi filogenetici sono stati esplorati e modificati utilizzando il software online iTOL v 6 che consente la visualizzazione, la manipolazione e l'annotazione degli alberi filogenetici.

3.7 Analisi bioinformatiche dei dati NGS

Il sequenziamento eseguito con piattaforma *Miseq System*, Illumina® è stato eseguito attraverso la modalità pair-end (PE) in cui ciascun frammento è stato sequenziato a partire da entrambe le estremità e in entrambe le direzioni ottenendo reads (R1 e R2) lunghe 300 pb in parte sovrapponibili tra loro. Il centro di sequenziamento si occupa della fase di *demultiplexing* ovvero di attribuire ogni *reads* ad un campione grazie alla presenza della sequenza *Barcode* restituendo le sequenze grezze in file formato FASTQ. I file FASTQ sono dei file di testo e rappresentano il formato standard dell'output delle piattaforme NGS; tali file associano ad ogni sequenza un codice alfa numerico, il *Quality Score*, sulla base dei singoli nucleotidi che la compongono. Il Quality score esprime quanto è accurata l'attribuzione di ogni nucleotide della sequenza e quanto quindi, il sequenziamento in quel punto della sequenza risulta affidabile. Il controllo della qualità delle *reads* è stato eseguito utilizzando il *software* FastQC (*Babraham Bioinformatics*) attraverso cui viene valutata la qualità delle *reads* R1 e R2 di ciascun campione fornendo come output il *Quality Score* che consente di stabilire l'affidabilità del sequenziamento. Per ogni insieme di *reads* relative a ciascun campione il software restituisce un output grafico in cui è riportato sull'asse delle x ogni posizione nella *reads* e sull'asse y il *Quality Score*. Sullo sfondo sono distinte 3 aree di colore diverso: verde (qualità buona)

arancione (qualità intermedia) e rosso (scarsa qualità) e per le diverse posizioni della *reads* è riportato un box plot le cui barre indicano la deviazione standard di ogni posizione e cioè la qualità media di quella determinata base nelle diverse *reads* del campione. Spesso la qualità si riduce con l'andare del processo di sequenziamento per cui è comune osservare come nella parte finale delle *reads* (porzione destra del grafico) le basi cadano nell'area arancione/rossa. Le elaborazioni delle sequenze sono state condotte utilizzando i software di seguito riportati.

3.7.1 QIIME2

Per le analisi successive è stato utilizzato QIIME2 (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) un software bioinformatico che consente di analizzare data set generati dal sequenziamento *pair-end* del gene rRNA 16 S attraverso piattaforma illumina come in questo studio. A QIIME 2 vengono dati in pasto i file grezzi ottenuti del sequenziamento i quali hanno estensione FASTA.gz; essi vengono convertiti da QIIME2 in file ad estensione “.qza” utilizzabili dallo stesso software. La prima operazione eseguita con QIIME2 ha riguardato l'eliminazione delle sequenze dei *primers* insieme a tutto ciò che era presente a monte di essi, quindi barcode, adattatori etc. L'operazione viene eseguita attraverso un apposito script e al termine il software restituisce due files ad estensione diversa: “.qza” necessario per il secondo step e “.qzv” necessario per la visualizzazione della qualità tramite il *software online* “QIIME 2 VIEW” (<https://view.qiime2.org/>). Questo software consente di visualizzare la distribuzione della qualità di una parte dei campioni, scelti in maniera randomica, mostrando sia le forward reads che le reverse reads; ciò consente di eseguire lo script successivo per QIIME2. La qualità delle reads deve essere visualizzata separatamente per le R1 e per le R2 per decidere in quale punto eseguire il *trunc*, ovvero il taglio delle sequenze. A questo punto è stato comunicato al software di eseguire il *merging* delle sequenze attraverso l'algoritmo DADA2 (*divisive amplicon denoising algorithm 2*), questo step è fondamentale poiché esegue dei confronti a coppie di tutte le *reads* di ciascun campione e sovrappone la regione complementare (parte finale) delle reads forward e reverse, al fine di creare la sequenza consenso della regione target. Se le reads non si sovrappongono vengono eliminate in quanto presentano estremità spurie e ciò consente dunque di effettuare un'ulteriore pulizia dei dati. Durante la fase di *merging* viene eseguito anche il *clustering* e cioè le varie reads allineate che condividono almeno il 97% di identità vengono raggruppate nella stessa OTU (*Operational Taxonomic Unit*). Questo step fornisce come output due file importanti per continuare l'analisi:

- Il file “Repseq.qza” in formato FASTA in cui è presente il *Feature* ovvero il codice identificativo di ogni OTU insieme alla sequenza nucleotidica
- La tabella “BIOM.qza” necessaria alle elaborazioni successive poiché contiene l’abbondanza di ciascuna OTU in ogni campione

La tabella è esportabile in file dall’estensione “biom” o “tsv” per le successive analisi. L’ultimo step riguarda la classificazione tassonomica delle OTU; per farlo è necessario scegliere un database che contenga tutte le sequenze del gene per l’rRNA 16S dei procarioti. È stato scelto a tale scopo il Database SILVA 138 SSU Ref NR 88 e una volta scaricato, insieme al file “Repseq.qza” ottenuto nel precedente step sono stati inseriti in QIIME2 in cui viene assegnata ad ogni OTU la tassonomia corrispondente. Il file ottenuto in questo step finale è il “Taxonomy.qza” in cui è presente il codice identificativo di ciascuna sequenza e accanto la tassonomia (regno, phylum, classe, ordine, famiglia, genere, e specie in alcuni casi). Il file Taxonomy.qza può essere esportato in un file di testo “.txt” e sarà utilizzato, insieme alla tabella “BIOM.qza” come file di input per le analisi successive.

3.7.2 MicrobiomeAnalyst

MicrobiomeAnalyst è un software online che consente l’analisi completa dei dati comunemente generati dagli attuali studi sul microbioma i quali devono però essere stati sottoposti ad un processo di preelaborazione come in questo caso attraverso l’utilizzo di QIIME2. MicrobiomeAnalyst consente di esplorare un’ampia varietà di metodi consolidati per l’elaborazione dei dati del microbioma, eseguire analisi statistiche complete, esplorare i risultati in tempo reale ed ottenere una migliore comprensione dei propri dati (Chong, 2020). È stato utilizzato il modulo Marker Data Profiling (MPD) il quale è dedicato all’analisi dei dati ottenuti a partire dal gene marcatore rRNA 16; come file di input sono stati utilizzati tre file di testo (.txt) due dei quali ottenuti dalla precedente elaborazione con QIIME2:

1. File di abbondanza, una tabella contenente nella prima colonna i *Features* assegnati ad ogni OTU e nella prima riga i codici identificativi degli 83 campioni; il corpo centrale della tabella contiene le abbondanze di ogni OTU in quel campione. Tale tabella è stata chiamata “silegereads”
2. File di tassonomia, una tabella in cui è presente accanto ai *Features* di ciascuna OTU l’identificazione tassonomica corrispondente, dal regno fino alla specie quando disponibile denominata “silagetaxa”

3. File metadata contenete le informazioni relative a ciascun campione e a fattori sperimentali:
Tesi, Tempo, Azienda, pH, denominato "silegemetadata"

Ciascun file, per poter essere utilizzato dal programma deve avere una specifica formattazione indicata nella pagina iniziale del software, una volta eseguita la preparazione e il caricamento dei dati si procede con la loro analisi fino ad arrivare alla loro esplorazione visiva. Attraverso MicrobiomeAnalyst è stata esplorata la diversità presente nei diversi campioni utilizzando l'indice di alpha diversity attraverso la metrica *Chao*. La diversità tra campioni è stata analizzata attraverso l'indice di beta diversity attraverso cui è stato creato *plot* denominato *2D PCoA Plot (Principal Coordinates Analysis)* in cui i campioni sono mappati all'interno di assi ortogonali in cui il principale presenta la maggior parte della variabilità e i restanti assi contengono la variabilità residua. Il metodo impiegato per calcolare la distanza è stato l'indice di Bray-Curtis, una misura quantitativa di dissimilarità tra comunità batteriche in cui la diversità è calcolata come $1 - (2w / (a + b))$ dove **w** è la somma delle abbondanze minime delle specie trovate in entrambi i siti, **a** è il numero totale di individui nel sito A e **b** è il numero totale di individui nel sito B.

4. Risultati e discussione

Il microbiota associato al foraggio appena raccolto svolge un ruolo critico nel processo di insilamento, esso è composto da una complessa miscela di batteri, lieviti e muffe con unità formanti colonie (UFC) che vanno da 10^5 a 10^9 ufc·g⁻¹ (McAllister et al., 2018). In questo lavoro di tesi abbiamo indagato l'evoluzione della comunità microbica di insilati di cereali autunno-vernini attraverso due approcci, uno coltura-dipendente e uno coltura-indipendente. Il primo ha previsto l'enumerazione delle colonie cresciute in MRSA (batteri lattici, LAB) e OGA (conta di Muffe e Lieviti), l'individuazione delle colonie dalla morfologia tipica, l'isolamento di queste nei rispettivi terreni e infine l'amplificazione e il sequenziamento Sanger del gene rRNA 16 S per i LAB e ITS1 e ITS2 per i funghi. Il secondo approccio di *metabarcoding*, anche detto metagenetica, si è basato invece sull'identificazione della composizione della comunità microbica attraverso l'analisi di una porzione più piccola del gene marcatore rRNA 16 S e sequenziamento con piattaforma NGS Illumina® Miseq System. Vediamo i risultati partendo da quelli ottenuti con l'approccio coltura-dipendente.

4.1 Risultati delle conte microbiologiche

Tutti i campioni inoculati con starter di LAB omofermentanti, eterofermentanti e il controllo (acqua), sono stati seminati in terreno MRSA e OGA per tutti i tempi testati (T0, T6 e T60) come descritto nella sezione dedicata di materiali e metodi. Tutte le piastre dei tre target e degli inoculi sono state sottoposte alla conta delle UFC (Unità formanti colonia) dopo i rispettivi tempi di incubazione. I due starter utilizzati (*KWS LACTOSTABILITY* e *KWS LACTOQUALITY*) sono stati anch'essi inoculati e incubati in MRSA per poter visualizzare e descrivere la morfologia dei ceppi puri presenti nei due starter. La morfologia delle singole colonie degli starter è descritta nella figura 11. A ciascun ceppo presente nell'inoculo è stata assegnata una morfologia (*A, B, C, D, E, ed F*) in modo tale da riuscire a riconoscere quelle determinate morfologie nelle colonie isolate dai diversi campioni e ottenere un riscontro dal sequenziamento Sanger.

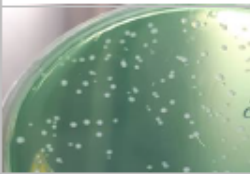






COLONIE IN MRSA	STARTER	MORFOLOGIA	SCIENTIFIC NAME
	Eterofermentante	Colonie Bianche/trasparenti piccole e puntiformi Morfologia G	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
	Omofermentante	Colonie Opercolate bianche medio grandi Morfologia E	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Omofermentante	Colonie Verde chiaro/trasparente piccole, viraggio terreno Morfologia B	<i>Enterococcus faecium</i>
	Omofermentante	Colonie opercolate gialle medio grandi Morfologia C	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	Omofermentante	Colonie bianche piatte medio grandi Morfologia D	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Omofermentante	Colonie bianche leggermente opercolate con bordi frastagliati. Medio grandi Morfologia F	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	Omofermentante	Colonie verdi piccole Morfologia A	<i>Enterococcus durans</i>

Figura 11. Descrizione della morfologia delle colonie isolate in MRSA dai due starter e identificazione tassonomica con sequenziamento Sanger

Dal momento in cui il trinciato fresco viene insilato, l'ossigeno viene gradualmente eliminato dall'utilizzo da parte di quelle specie dal metabolismo fermentativo (microorganismi epifiti e/o starter), si creano le condizioni di anaerobiosi e di pH acido con una riduzione della diversità microbica degli insilati rispetto al trinciato fresco. Questo dipende dal fatto che i microorganismi aerobi obbligati, e quelli sensibili agli acidi organici vengono inibiti (McAllister et al., 2018). Nella figura 12 viene valutata la concentrazione logaritmica (UFC/g) dei LAB nelle 3 tesi; come si può

vedere dalla figura 12 l'evoluzione dei LAB in funzione del tempo ha mostrato il livello massimo a 6 giorni di fermentazione, che potrebbero corrispondere alla fase fermentativa principale in cui in ambiente anaerobio i LAB competono con i microorganismi epifiti anaerobi facoltativi (Pahlow et al. 2003). Risultati analoghi sono stati osservati da (Schmidt et al., 2009) in cui la concentrazione di LAB in insilati di erba medica ha mostrato un picco dopo 5 giorni di insilamento. Tuttavia, le differenze statistiche tra le tesi studiate, sono state osservate solo al termine dei 60 giorni (p-value 0,00045). I campioni inoculati con gli starter eterofermentanti hanno mostrato i valori di LAB più alti alla fine del periodo di insilamento, oltre il livello di 8,5 Log CFU/g. Questo potrebbe dipendere dal fatto che gli insilati inoculati con *Lentilactobacillus buchneri* hanno spesso un pH superiore di 0,1-0,2 unità rispetto a quelli non trattati (Kung et al., 2018) e questo potrebbe portare ad una maggiore persistenza di LAB alla fine della fermentazione poiché nel tempo la concentrazione di LAB tende a ridursi per effetto del basso pH e della mancanza di substrati fermentabili (Schmidt et al., 2009). Un'altra spiegazione possibile è che lo starter eterofermentante si adatti meglio a questa matrice sopravvivendo fino al termine dell'insilamento.

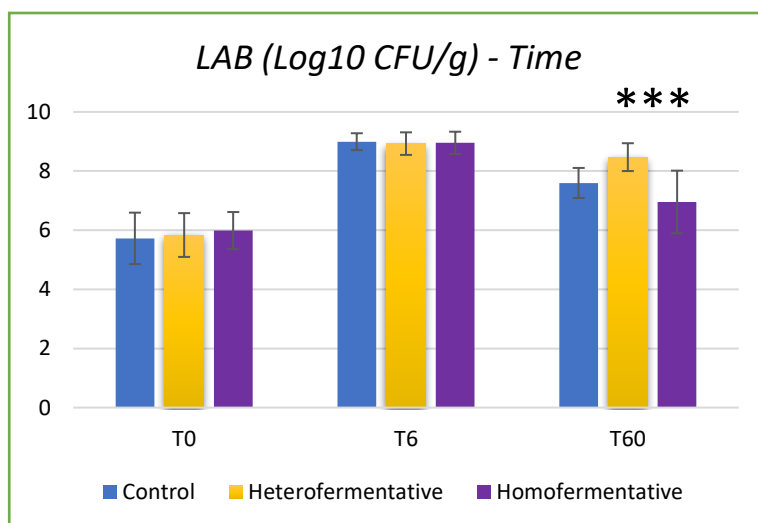


Figura 12. Evoluzione dei LAB durante il periodo di fermentazione (tempo; 60 giorni). I dati rappresentano la media di 9 campioni (3 aliquote per 3 condizioni di DM) \pm deviazione standard. Valori P (***) $>$ 0,001. Sono stati considerati tre diversi tempi di campionamento (0; 6 e 60 giorni)

La classificazione dei campioni sulla base del contenuto di sostanza secca (DM1, DM2 e DM3) è stata utilizzata per discriminare i campioni provenienti dalle 3 diverse aziende in base al loro livello di umidità; i valori relativi al contenuto di sostanza secca sono stati determinati presso un altro

laboratorio, come riportato nella sezione di materiali e metodi, e i risultati per i tre campioni sono i seguenti:

- Campioni raccolti nell'azienda P (DM1) → 43.4% (DM alta)
- Campioni raccolti nell'azienda A (DM2) → 31.2% (DM bassa)
- Campioni raccolti nell'azienda M (DM3) → 34.8% (DM media)

Come si vede dalla figura 13 la stratificazione dei dati in base alla tesi DM1 (contenuto di sostanza secca alto, 43.4%) ha suggerito che questa condizione ha favorito la persistenza degli eterofermentanti mostrando il livello più alto di LAB (vicino a 9 Log CFU/g). Tuttavia, l'inoculo iniziale per la DM1 è stato il più basso, con 5 Log CFU/g di LAB al T0.

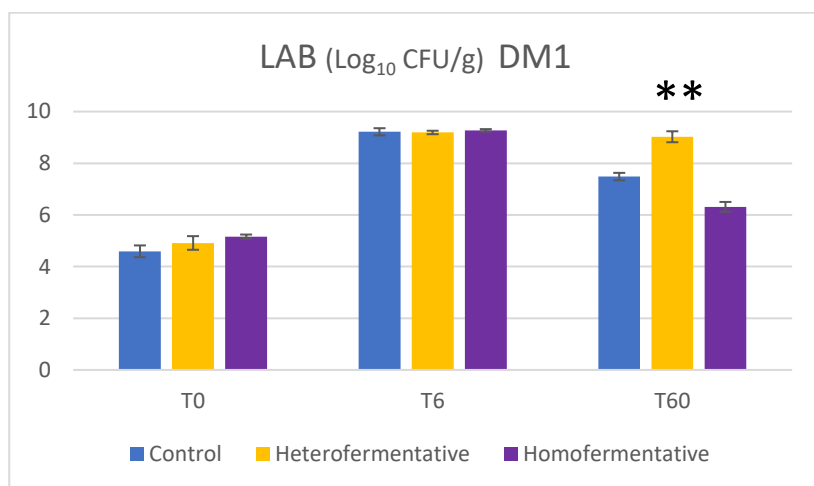


Figura 13. Evoluzione dei LAB durante il periodo di fermentazione (tempo; 60 giorni) stratificato per DM1. I dati rappresentano la media di 3 campioni secondo le tre condizioni di inoculo \pm deviazione standard. Valori P (***) $>$ 0,001). Sono stati considerati tre diversi tempi di campionamento (0; 6 e 60 giorni).

Le muffe (figura 14) hanno mostrato una progressiva riduzione durante il periodo di fermentazione a 6 giorni di fermentazione i livelli di contaminazione sono diminuiti a circa 2 Log CFU/g. Il livello finale osservato era di circa 2,8 Log CFU/g (60 giorni di conservazione). La contaminazione iniziale era simile tra le 3 tesi e le aziende (5,4 Log CFU/g) senza alcuna influenza del contenuto di sostanza secca (DM) (figura 15). I lieviti hanno mostrato un livello finale di 4,4 Log CFU/g con una leggera riduzione nel corso del tempo (dati non mostrati).

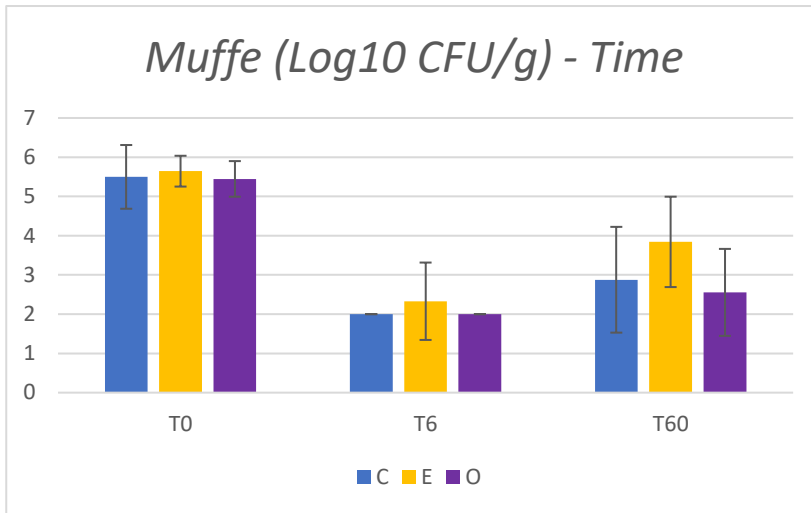


Figura 14. Evoluzione delle muffe durante il periodo di fermentazione (tempo; 60 giorni). I dati rappresentano la media di 9 campioni (3 aliquote per 3 condizioni di DM) \pm deviazione standard. Sono stati considerati tre diversi tempi di campionamento (0; 6 e 60 giorni)

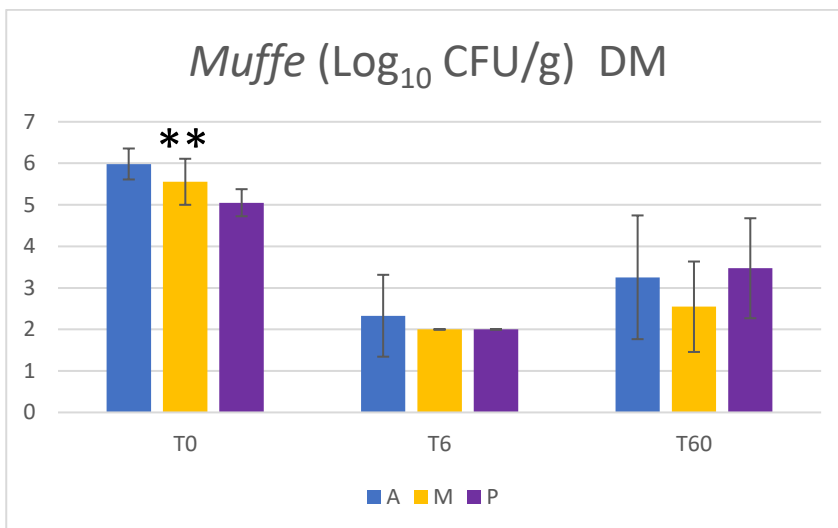


Figura 15. Evoluzione delle muffe durante il periodo di fermentazione (tempo; 60 giorni) stratificato per DM. I dati rappresentano la media di 3 campioni secondo le tre condizioni di inoculo \pm deviazione standard. Valori P (***) $>$ 0,001. Sono stati considerati tre diversi tempi di campionamento (0; 6 e 60 giorni).

4.2 Risultati del sequenziamento Sanger

4.2.1 PCR

Come descritto nella sezione di materiali e metodi, le colonie seminate individualmente in MRS e OGA sono state sottoposte all'estrazione del DNA utilizzando uno specifico protocollo di estrazione termica. Il DNA di ogni colonia è stato estratto ed amplificato tramite PCR. Tutti i prodotti di PCR

sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio per la valutazione qualitativa del processo di amplificazione in termini di presenza e/o assenza della banda e del suo corretto posizionamento rispetto al marcatore di corsa. Nella figura 16 è mostrata l'immagine dell'elettroforesi in agarosio delle colonie dalla 17 alla 24 isolate in MRSA e i controlli + e -. Tutte le colonie correttamente amplificate come quelle raffigurate in figura 15 sono state purificate attraverso il kit EuroSAP PCR Enzymatic Clean-up specifico per la rimozione di dNTPs e primers e preparate per il sequenziamento Sanger. In totale si sono amplificate correttamente 211 colonie isolate in MRSA con i *primers* specifici per il 16S rRNA e 32 colonie isolate in OGA con i *primers* specifici per ITS1 e ITS2 che sono state quindi sottoposte a sequenziamento Sanger.

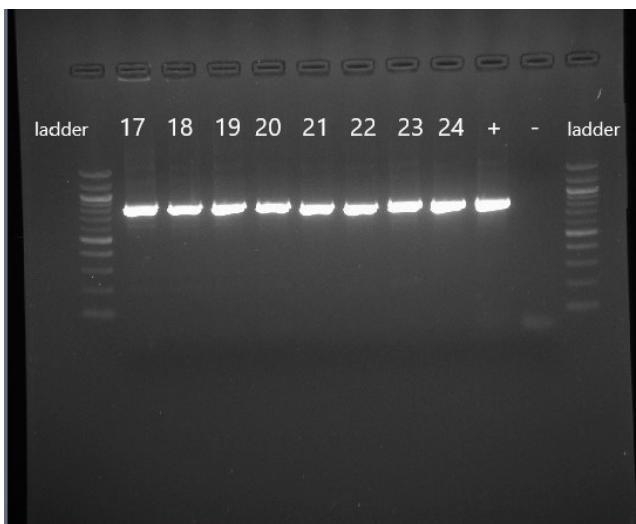


Figura 16. Gel di elettroforesi delle colonie isolate in MRSA in cui la posizione e la dimensione erano quelle corrette per il target 16S rRNA

4.2.2 Sequenziamento Sanger

Ciascun cromatogramma restituito dal centro di sequenziamento è stato valutato singolarmente e sono state eliminate le parti illeggibili (rumore di fondo, siti di attacco dei primers). La sequenza di ciascun cromatogramma convertita in formato FASTA è stata confrontata allineata in locale utilizzando il *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) dell'NCBI come descritto nella sezione di materiali e metodi, per l'identificazione della specie. Attraverso il software MEGA v. 6 sono state eseguite le analisi filogenetiche per i LAB e per le muffe e i lieviti nei tre tempi studiati (T0, T6 e T60) in relazione al tipo di inoculo addizionato o al controllo.

4.2.3 Risultati Sanger T0

Il sequenziamento del gene 16S rRNA delle colonie isolate in MRSA dei campioni del T0 ci permette di fare delle valutazioni qualitative sulla varietà di LAB selvaggi, ovvero quelli appartenenti alla flora epifita della pianta non addizionati con gli inoculi. In totale sono state isolate 76 colonie per tutte tre le tesi, di queste colonie 64 sono stati identificati come ceppi wild. Tra i ceppi wild sono stati rilevati 3 generi delle *Lattobacillacea*

- ***Weissella*** (*cibaria*, *paramesenteroides*, *confusa*, *hellenica*)
- ***Leuconostoc*** (*mesenteroides*, *lactis*, *garvieae*)
- ***Levilactobacillus brevis***

Nella figura 17 è mostrato l'albero filogenetico relativo alle specie isolate dai campioni del T0 in relazione al tipo di inoculo impiegato eterofermentante (blu), omofermentante (rosso) e il controllo (giallo). Sono differenziate le specie wild (in verde) dalle specie starter (in azzurro) presenti negli inoculi. Come si può osservare nei campioni del T0 predominano le specie di LAB wild e questo è del tutto giustificato nel controllo in cui non è stato addizionato alcun ceppo starter, mentre nei campioni addizionati con inoculi di LAB eterofermentanti o omofermentanti può essere spiegato dal fatto che i campioni del T0 erano costituiti da trinciato fresco non sottoposto ad alcun periodo di insilamento per cui le specie starter non hanno avuto modo di prevalere dominando la fermentazione. Le specie identificate come starter sono quelle isolate a partire dai campioni inoculati con uno dei due starter e quindi presumibilmente sono state isolate dall'inoculo omogeneizzato con il trinciato fresco. Tra le specie starter isolate dai campioni omofermentanti è stata isolata e identificata la specie di *Enterococcus faecium* e *Lactiplantibacillus plantarum* la cui descrizione della morfologia della colonia corrisponde alla *morfologia B ed E* rispettivamente, descritte a partire dalle colonie dello starter. Non è stata identificata invece la specie di *Pediococcus pentosaceus* che insieme alle altre due componeva lo starter omofermentante. Le colonie di *Pediococcus pentosaceus* sono state rilevate invece sia nel campione di controllo che in quello eterofermentante in cui si trattava di specie wild. Per quanto riguarda invece le specie starter identificate nel campione eterofermentante è stata rilevata la specie *Lentilactobacillus buchneri* dalla *morfologia G*, il che era prevedibile essendo l'unica specie presente nell'inoculo eterofermentante.

- W-S**
- Wild
 - Starter

- E-O-C**
- Eterofermentante
 - Omofermentante
 - Controllo

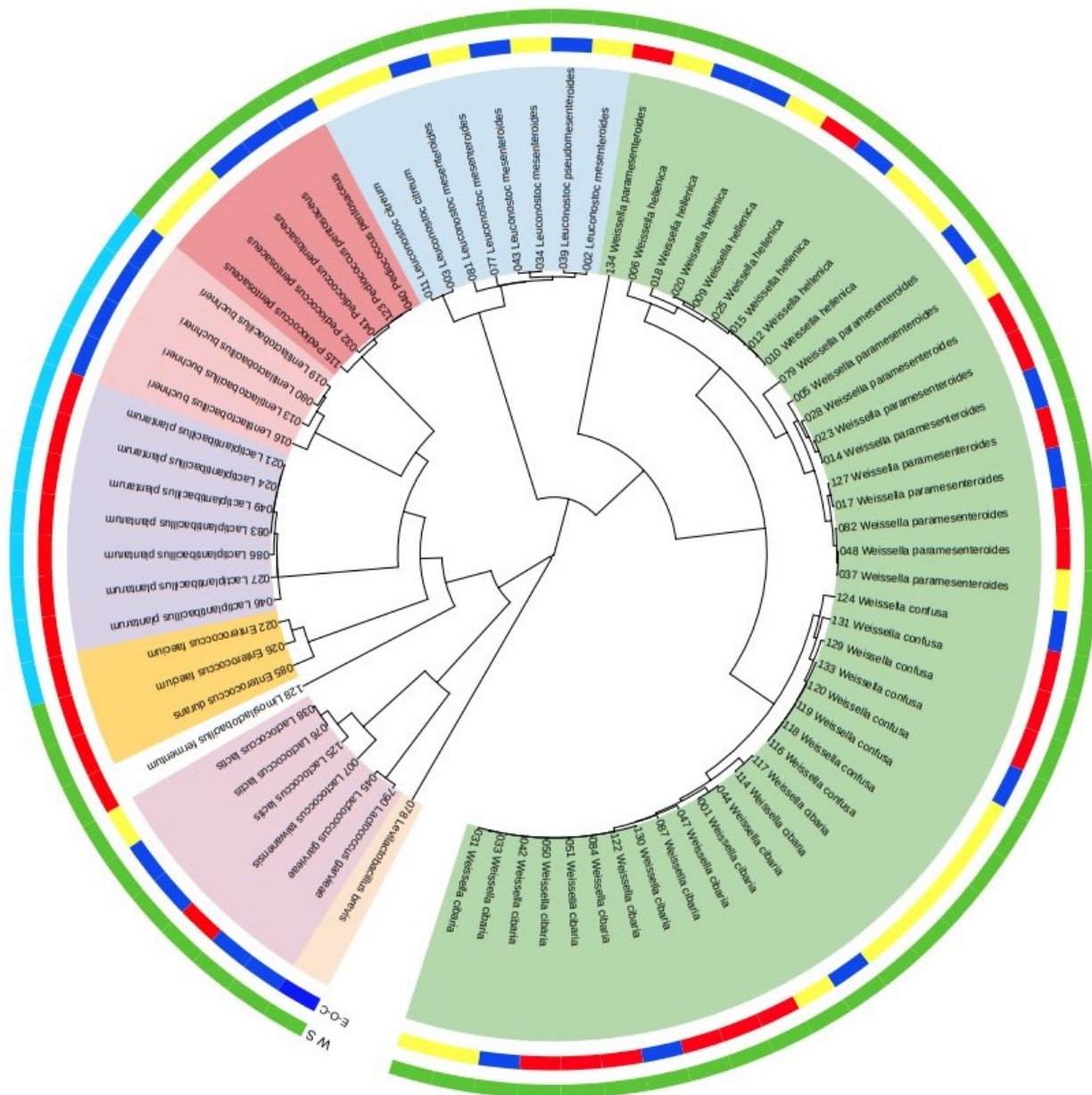


Figura 17. Albero filogenetico del T0 ottenuto con il software iTool

4.2.4 Risultati Sanger T6

I ceppi isolati a partire dai campioni sottoposti a 6 giorni di insilamento sono mostrati nella figura 18. L'immagine rappresenta l'albero filogenetico costruito a partire dalle colonie isolate e sequenziate dai campioni del T6. Dopo 6 giorni di fermentazione il contributo delle specie selvatiche è diminuito rispetto al T0, In totale 59 colonie sono state isolate e i generi più isolati sono stati *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weisella*. Come si può notare dalla figura 18 confrontata con quella del T0 (figura 17) in cui erano stati identificati 9 generi qui vi è una riduzione dei taxa, e sono presenti 6 generi. Rispetto al T0 non è stata isolata nessuna specie appartenente a *Lactococcus spp.*, *Limosilactibacillus spp.* ed *Enterococcus spp.* Quest'ultimo era tra i ceppi presenti nell'inoculo omofermentante. A 6 giorni dall'insilamento si è nella fase 2 ovvero nella fase della fermentazione principale in cui esaurisce l'ossigeno e inizia lo sviluppo di una popolazione dominante di LAB (Pahlow et al., 2003) Queste analisi, condotte su un target specifico, il gene 16 S rRNA a partire dalle colonie pure isolate dal terreno MRSA ovvero un terreno specifico per l'isolamento di LAB, non consentono di valutare l'eventuale riduzione della flora epifita aerobia per questo si rimanda ai risultati dell'analisi della comunità microbica approfondito nei prossimi paragrafi.

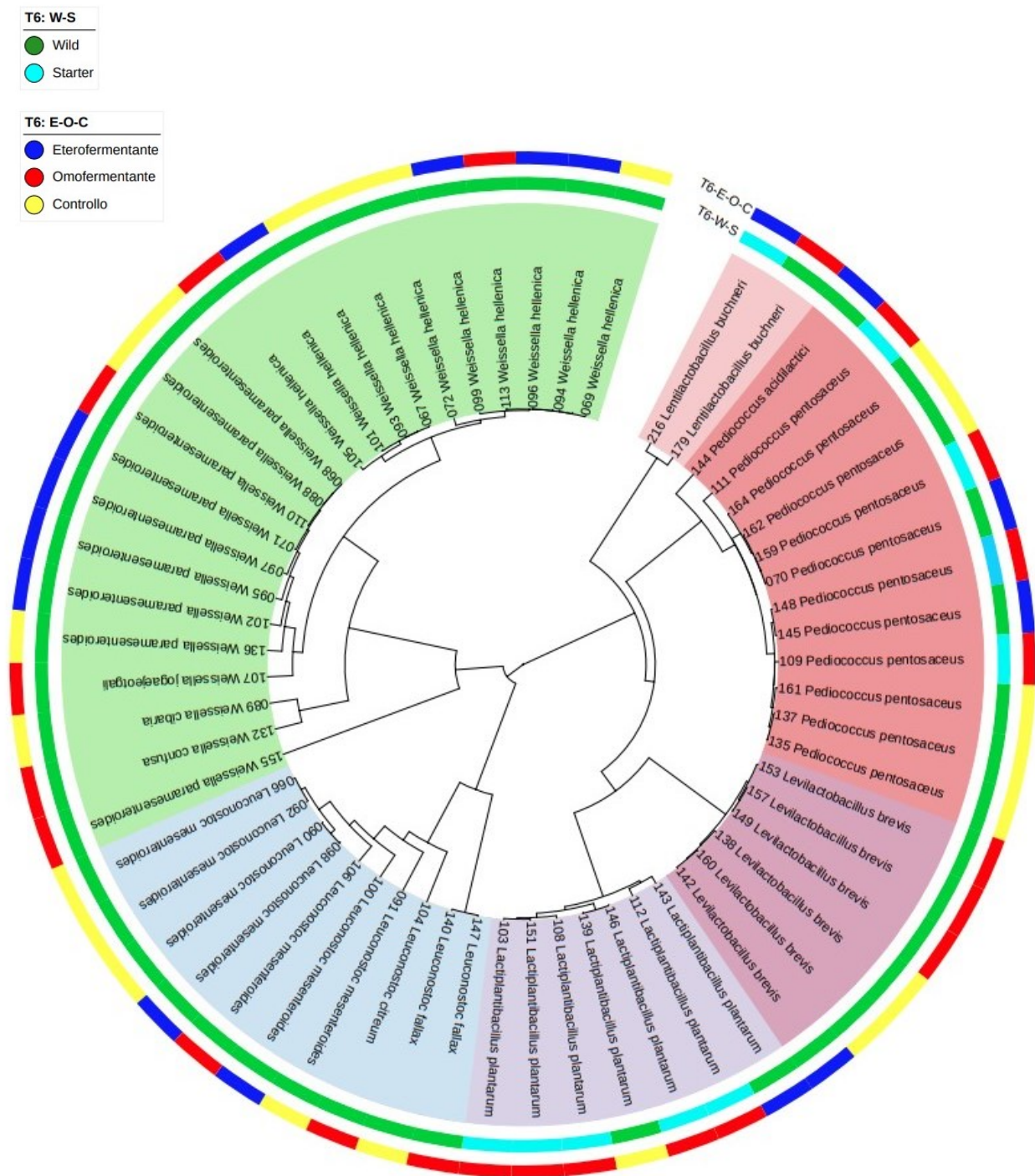


Figura 18. Albero filogenetico del T6 ottenuto con il software iTool

4.2.5 Risultati Sanger T60

I ceppi isolati a partire dai campioni sottoposti a 60 giorni di insilamento sono mostrati nella figura 19. Alla fine del periodo di fermentazione, la specie dominante è stata *Lentilactobacillus buchneri* raccolta da tutte le tesi (controllo, eterofermentativa e omofermentativa). *Lentilactobacillus buchneri* diventa la specie dominante nelle fermentazioni prolungate degli insilati (Muck et al., 2018). Questo può dipendere dal fatto che questa specie si sviluppa molto lentamente durante la fermentazione e infatti i suoi effetti (produzione di acido-acetico e 1,2-propandiolo) sono evidenti solo dopo 45-60 giorni di fermentazione (Schmidt et al., 2009). Le ragioni di questo ritardo nella conversione del lattato in 1,2- propandiolo sono sconosciute (Muck et al., 2018). Come si può notare confrontando la figura con quelle relative al T0 e al T6 vi è un'ulteriore riduzione della varietà dei taxa, di fatto sono stati isolati e sequenziati 76 ceppi appartenenti principalmente a 4 generi delle Lactobacillaceae: *Lentilactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Levilactobacillus spp.*, *Lactiplantibacillus spp.* Tra le specie principalmente rilevate nel controllo, in cui la fermentazione è stata esclusivamente dominata dai LAB epifiti, 12 ceppi appartengono alla specie *Levilactobacillus brevis*, si tratta di LAB dal metabolismo eterofermentativo ampiamente descritte nelle fermentazioni spontanee di vegetali e cereali (Zheng et al., 2020). Oltre a questo ceppo nel controllo sono state isolate 6 colonie appartenenti a *Lactiplantibacillus plantarum*, questa specie di LAB dal metabolismo omofermentativo è tra quelle maggiormente utilizzate come inoculanti microbici per migliorare la fermentazione degli insilati (Muck et al., 2007) ed è presente in diverse nicchie ambientali tra cui la superficie dei vegetali e per questo è un membro dominante nelle fermentazioni spontanee di quest'ultimi (Zheng et al., 2020). Dei 23 ceppi isolati dai campioni inoculati con gli starter eterofermentanti che ricordiamo contenevano esclusivamente *Lentilactobacillus buchneri*, 17 appartenevano appunto a *Lentilactobacillus buchneri* e questo può dimostrare come tale specie, addizionata con lo starter, nel corso dei 60 giorni di insilamento abbia dominato nella fermentazione. Come già detto si tratta di un LAB dal metabolismo eterofermentante ampiamente utilizzato come inoculante; esso converte lentamente l'acido lattico in acido acetico e 1,2-propandiolo durante la conservazione in silo, migliorando la stabilità aerobica all'apertura del silo grazie alla sua attività antifungina tipica degli acidi grassi a corta catena, senza avere alcun effetto sulla produttività animale (Carvalho et al., 2020, Muck et al., 2018). Per quanto riguarda i campioni inoculati con lo starter omofermentante che ricordiamo conteneva i ceppi di *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus*, l'unico ceppo appartenente agli

starter isolato nei campioni del T60 è stato *Lactiplantibacillus plantarum* mentre non sono state isolate e sequenziate colonie appartenenti alla specie *Enterococcus faecium* e *Pediococcus pentosaceus*. Il mancato isolamento di queste due specie, pur non trattandosi di un approccio metagenomico quantitativo, può essere in parte spiegato dal fatto che le popolazioni di pediococchi ma soprattutto di enterococchi, hanno un tasso di crescita più elevato quando il pH è a valori > 5,0 e l'ossigeno è presente; quando il pH si riduce queste popolazioni diminuiscono bruscamente rispetto a specie come *Lactiplantibacillus plantarum*. Il pH della massa insilata nei campioni inoculati con lo starter omofermentante dopo 60 giorni ha raggiunto valori medi di 3.95 che quindi limiterebbe la crescita di enterococchi e pediococchi. Pertanto, le specie di *Enterococcus* da sole non sono generalmente in grado di migliorare la qualità dell'insilato. (Muck et al., 2007) A conferma di questo, il genere *Enterococcus spp.* è stato rilevato nei campioni del T60 dallo studio delle comunità in piccola percentuale (1%), diversamente dal genere *Pediococcus spp* (10%). *Enterococcus faecium* sviluppandosi a pH più elevati domina la flora epifita nelle fasi iniziali della fermentazione (Oliveira et al., 2017) e quindi a 6 giorni e 60 giorni di insilamento la sua crescita potrebbe essere già rallentata. Oltre a *Lactiplantibacillus plantarum* nei campioni sono state isolate le specie di *Lentilactobacillus buchneri* e *Levilactobacillus brevis* entrambe di origine autoctona. Questi dati hanno mostrato uno spostamento dei diversi generi e specie nel corso della fermentazione, tuttavia verranno effettuate analisi più approfondite in base ai risultati delle sequenze genetiche successive ottenuto dallo studio delle comunità.

T60: W-S
 ● Wild
 ● Starter

T60: E-O-C
 ● Eterofermentante
 ● Omofermentante
 ● Controllo

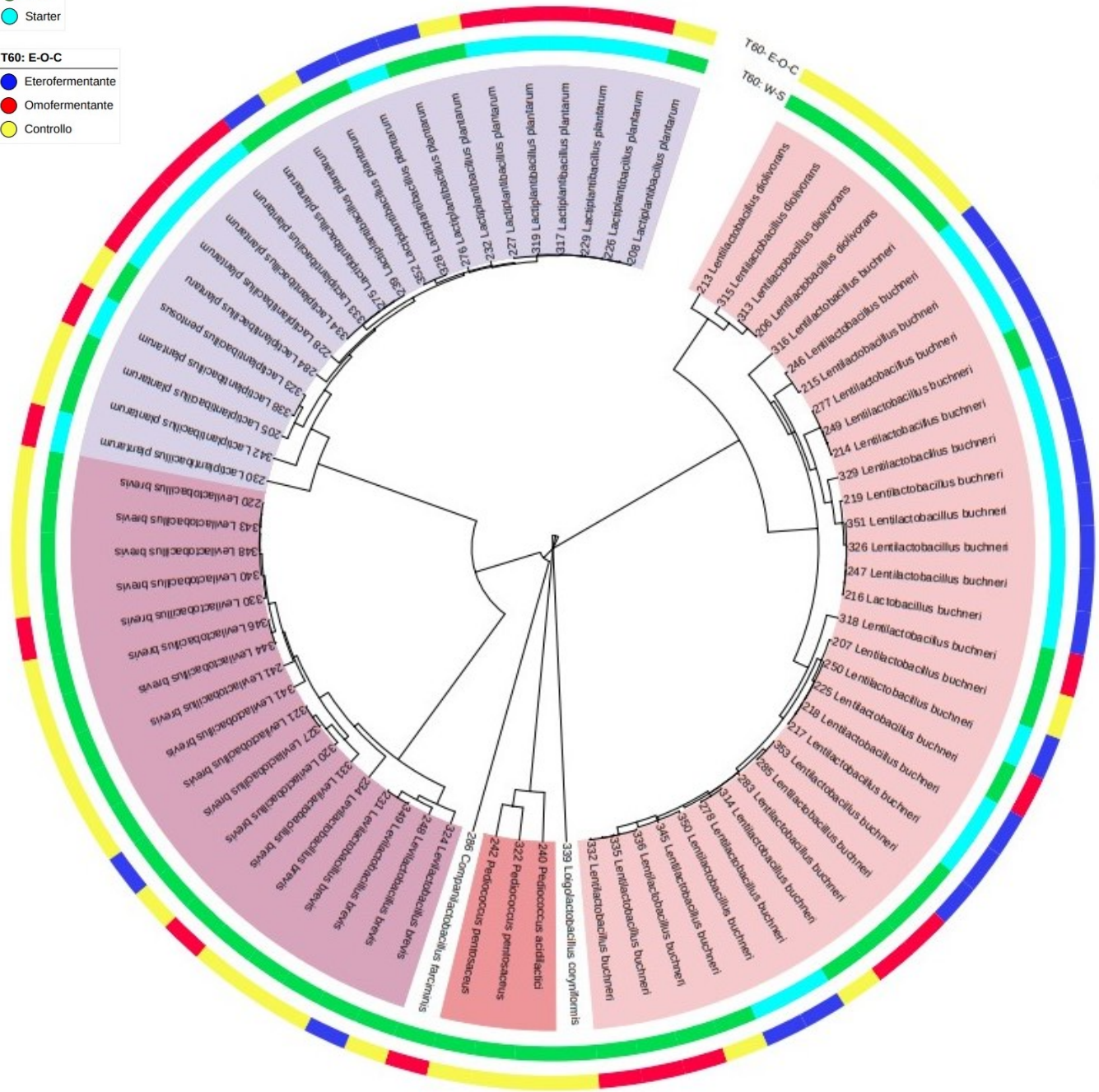


Figura 19. Albero filogenetico del T60 ottenuto con il software iTool

4.3 Risultati analisi della comunità con sequenziamento NGS

Per lo studio delle comunità microbiche si è utilizzato un approccio di *Metabarcoding*, il quale permette l'identificazione della composizione tassonomica di una nicchia mediante l'amplificazione e il sequenziamento high-throughput dei geni marcatori, come il gene rRNA 16S per i procarioti, l'ITS per i funghi e il 18S per la maggior parte degli eucarioti (*Semenov, 2021*). La presenza di un gene marcatore è proprio ciò che distingue l'approccio di *Metabarcoding* dalla *Metagenomica* che attraverso tecniche di sequenziamento shotgun di interi genomi consente di studiare il metagenoma, ovvero l'intero genoma di una comunità di microorganismi. (*Semenov, 2021*). Il vantaggio principale delle tecnologie NGS rispetto al sequenziamento Sanger è rappresentato dal sequenziamento in parallelo di volumi maggiori di materiale genetico, ciò consente di velocizzare i tempi e ridurre i costi. Uno dei principali limiti delle tecnologie NGS riguarda la ridotta lunghezza delle reads che si ottengono, in questo caso 300 pb, mentre il sequenziamento Sanger consente di sequenziare in maniera affidabile ampliconi fino a 1000 pb e ottenere informazioni più specifiche.

4.3.1 Valutazione dell'effetto degli inoculi sulla comunità microbica degli insilati di cereali autunno-vernini

Dopo la pulizia delle sequenze grezze restituite dal centro di sequenziamento, attraverso il software bioinformatico QIIME2 i file di output del programma (file di abbondanza delle OTU e il file di tassonomia) sono stati utilizzati per le elaborazioni nel software online MicrobiomeAnalyst. Insieme ai due file restituiti da QIIME è stato creato un file di testo, il file metadata, in cui ogni campione è stato associato alla tesi, al tempo e all'azienda corrispondente. I campioni del T6 e del T60 sono stati classificati in tre categorie sulla base dei valori di pH determinati presso un altro laboratorio come riportato:

- High > 4,22
- Medium 4,01-4,22
- Low < 4,01

I file di input in MicrobiomeAnalyst per l'analisi delle comunità contenevano un totale di 2796125 reads e un totale di 1236 OTU con più di 2 reads, l'annotazione delle OTU è stata fatta attraverso il confronto con il database SILVA. La qualità e il numero delle reads è stato sufficiente per le analisi. La beta-diversity indica come varia la diversità tra campioni e può essere rappresentata mediante la

grafica della PCoA (Principal Coordinate Analysis) (figura 20). La figura rappresenta la distanza (diversità) genetica tra le OTU dei 3 gruppi (T0, T6, e T60). Il valore di similarità calcolato dal software a coppie tra tutti i campioni viene correlato non solo alla presenza/assenza ma anche all'abbondanza di ciascuna OTU (in questo caso correlata al numero di reads). Sulla base dell'abbondanza, la % di similarità viene trasformata in un indice, l'indice di Bray-Curtis, una misura quantitativa di similarità tra comunità batteriche molto utilizzato negli studi di ecologia microbica. Questo indice pesa in maniera differente i taxa meno abbondanti e quelli più abbondanti, tenendo quindi conto delle abbondanze di ciascun taxa nelle elaborazioni dei dati. Le differenze tra comunità a livello di OTU sono state testate attraverso il test non parametrico con permutazioni PERMANOVA e visualizzate mediante l'analisi non parametrica PCoA. Nella figura 20 le coordinate utilizzate sono rappresentate dall'asse 1 e 2 e spiegano rispettivamente il 30% e il 24,7% della variabilità. Dalla figura si può osservare come i tre gruppi corrispondenti ai tre tempi di insilamento non si staccano mai e anzi il T6 risulta completamente sovrapposto al T60. La maggior compattezza dei campioni del T6 indica una minore inter-variabilità tra i campioni dello stesso tempo. La distanza tra i campioni del T0 e gli altri due tempi è la maggiore, questo può essere dovuto al processo di fermentazione che seleziona i microorganismi anaerobi obbligati o anaerobi facoltativi selezionando quindi quelle specie dal metabolismo fermentativo in grado di sopravvivere in ambiente anaerobio e in condizioni di basso pH.

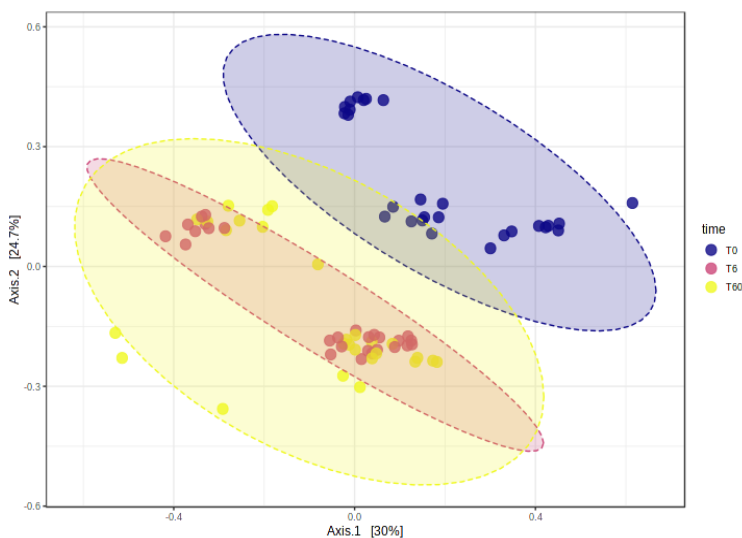


Figura 20. PCoA dei campioni raccolti nei 3 diversi tempi (T0, T6 e T60) utilizzando l'indice Bray-Curtis; p-value: 0.001

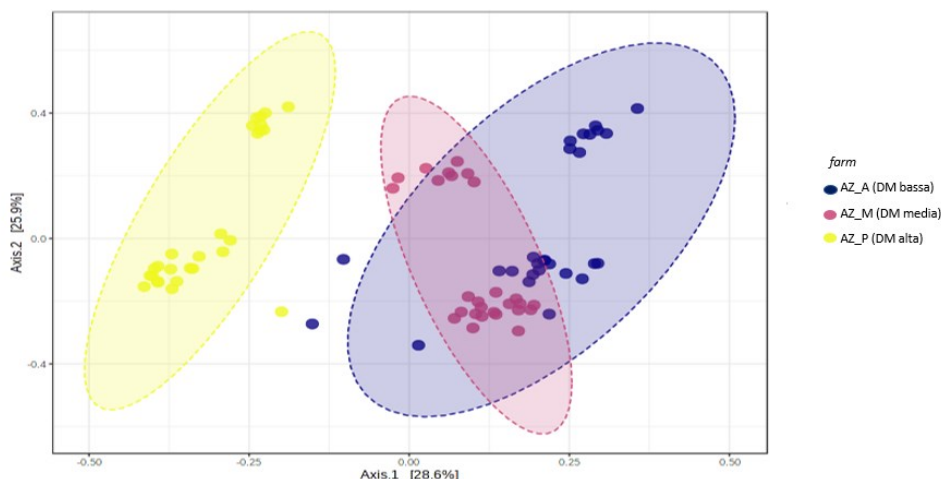


Figura 21. PCoA dei campioni raccolti nelle 3 aziende utilizzando l'indice Bray-Curtis; p-value: 0.001

Nella figura 21 è stata esplorata la diversità tra i campioni raccolti nelle tre diverse aziende classificati sulla base del contenuto di sostanza secca (DM). I campioni della azienda P che presentano un livello alto di sostanza secca (43,4%), sono compatti e non sovrapposti a quelli dell'azienda M ed A. Questo indica una minore intra-variabilità tra i campioni dell'azienda P e una maggiore inter-variabilità rispetto ai campioni raccolti nelle aziende A ed M. Questo può essere correlato sia al diverso contenuto di sostanza secca al momento dell'insilamento e sia alla diversa matrice dei campioni dell'azienda P; infatti mentre gli insilati raccolti nelle aziende A ed M sono costituiti da frumento, quelli dell'azienda P sono un miscuglio di frumento e avena. La maggiore diversità tra i campioni raccolti nell'azienda P e quelli raccolti nelle aziende A ed M (p-value: 0.001) può essere quindi spiegata dalla diversa composizione vegetale dell'insilato e dai più bassi livelli di umidità dei campioni dell'azienda P. I campioni raccolti nell'azienda A (DM bassa 31.2%) mostrano maggiore variabilità in termini di OTU che si sovrappone in parte ai campioni dell'azienda M e può in parte essere dovuta alla stessa composizione vegetale (frumento). Nella figura 22 è stata esplorata la diversità tra i campioni delle tre diverse tesi: controllo (C), eterofermentante (E) ed omofermentante (O). I tre gruppi risultano completamente sovrapposti l'uno all'altro suggerendo come la diversità tra i campioni delle tra diverse tesi non sia significativa (p-value 0,16).

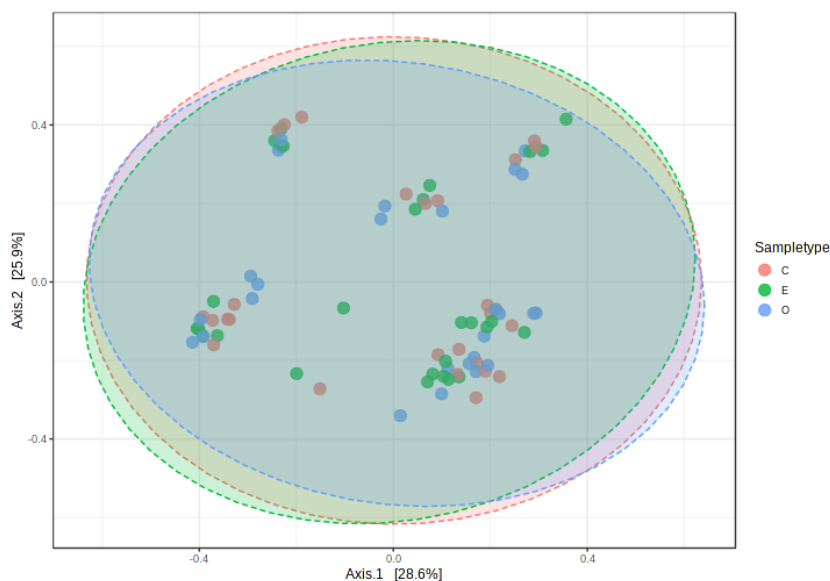


Figura 22. PCoA dei campioni delle 3 tesi: C (controllo), E (eterofermentante), O (omofermentante) utilizzando l'indice Bray-Curtis; p-value: 0.16

4.4 Valutazione dell'alpha-diversity

Tra gli obiettivi di questo lavoro di tesi vi era quello di valutare in quale misura l'utilizzo di uno o dell'altro starter influenzasse la composizione della comunità microbica rispetto al controllo, e quindi l'abbondanza relativa delle diverse specie al termine della fermentazione. Visto l'utilizzo di due diversi approcci di analisi un altro obiettivo è stato quello di poter confrontare i dati dello studio delle comunità con sequenziamento NGS con quelli ottenuti dal sequenziamento Sanger. Infatti una delle differenze tra i due approcci, coltura-dipendente e coltura indipendente, è che con il primo si riesce ad identificare con un certo livello di affidabilità, fino al livello tassonomico della specie, mentre con il secondo approccio spesso ci si limita al genere. Questo dipende in gran parte dalla lunghezza della regione target del gene 16S amplificata, lunga 800 pb nel caso del sequenziamento Sanger e di 300 pb nel caso del sequenziamento NGS. I due approcci devono pertanto essere intesi come complementari l'uno all'altro poiché consentono di ottenere informazioni che insieme permettono di avere un quadro più organico e completo dell'evoluzione dei vari taxa dall'inizio alla fine del processo di fermentazione. La diversità microbica all'interno di ciascun campione viene valutata utilizzando l'Alpha-diversity (Richness R), un indice che spiega la variabilità dei taxa all'interno dei singoli campioni raggruppati secondo precise variabili categoriche. Nella figura 23 l'indice di Alpha-diversity è stato calcolato nei gruppi utilizzando le variabili tesi, tempo e azienda

(DM). La diversità è stata calcolata con la metrica Chao1, la quale stima la diversità a partire dall'abbondanza e assumono importanza le OTU rare. L'Alpha-diversity calcolata nei campioni sottoposti a diversi tempi di insilamento (figura 23 a) è statisticamente significativa ($p\text{-value } 4,2 \times 10^{-9}$). Al T0 l'Alpha-diversity è maggiore e simile tra tutti i campioni e non ci sono valori outlier. Al T6 l'Alpha-diversity si riduce rispetto al T0 e questo dipende dall'avvio del processo fermentativo che determina una riduzione della Richness selezionando quelle specie in grado di adattarsi e sopravvivere. La riduzione della Alpha-diversity tra i campioni del T6 è però varia intra-gruppo e questo è dato dalla maggiore ampiezza del rettangolo centrale che rappresenta il range interquartile (IQR). Questo indica come la Richness al T6 sia influenzata dalle altre variabili studiate. I campioni del T60 mostrano una tendenza coerente con quella dei campioni del T6 ma la minore ampiezza del range interquartile rispetto al T6 ci suggerisce come la Richness sia più simile all'interno di questo gruppo pur essendoci diversi campioni con una diversità superiore alla media ma anche campioni inferiori alla media e fuori dal range (outlier). Indagando su quali fossero i campioni del T60 con una Richness maggiore è stato visto trattarsi dei campioni 64, 70 e 71 tutti provenienti dall'azienda A (DM bassa) di cui un controllo (il 64) e due omofermentanti (70 e 71). Nella figura 23 b l'Alpha-diversity viene valutata nei campioni raccolti nelle tre diverse aziende che come detto sono stati classificati anche in base al loro contenuto di sostanza secca (DM) al momento dell'insilamento. Anche in questo caso le differenze in termini di Richness nei campioni raccolti nelle diverse aziende sono significative ($p\text{-value } 0,0002$). Come si può vedere dalla figura 23.b i campioni raccolti nell'azienda A (DM bassa 31.2%) e P (DM alta 43,4%) presentano la maggiore disomogeneità in termini di Richness. In media però i campioni a DM bassa (azienda A) presentano livelli di Alpha-diversity maggiori rispetto a quelli a DM alta (azienda P). I campioni raccolti nell'azienda M a medio contenuto di DM (34.8%) mostrano livelli Richness minori e più simili ed omogenei tra di loro suggerendo come il livello di umidità abbia influenzato la diversità dei taxa. Nella figura 23.c viene studiata l'Alpha-diversity dei campioni classificati in base alla tesi studiata e quindi agli starter utilizzati (omofermentante, eterofermentante o il controllo). In questo caso le differenze in termini di Richness nei campioni inoculati con i due starter e il controllo non sono significative ($p\text{-value } 0,9363$) e questo suggerisce come l'impiego di starter eterofermentanti, omofermentanti o il controllo non influisce in termini di Richness nei campioni di insilati. Vediamo adesso l'abbondanza dei diversi generi di taxa nei campioni.

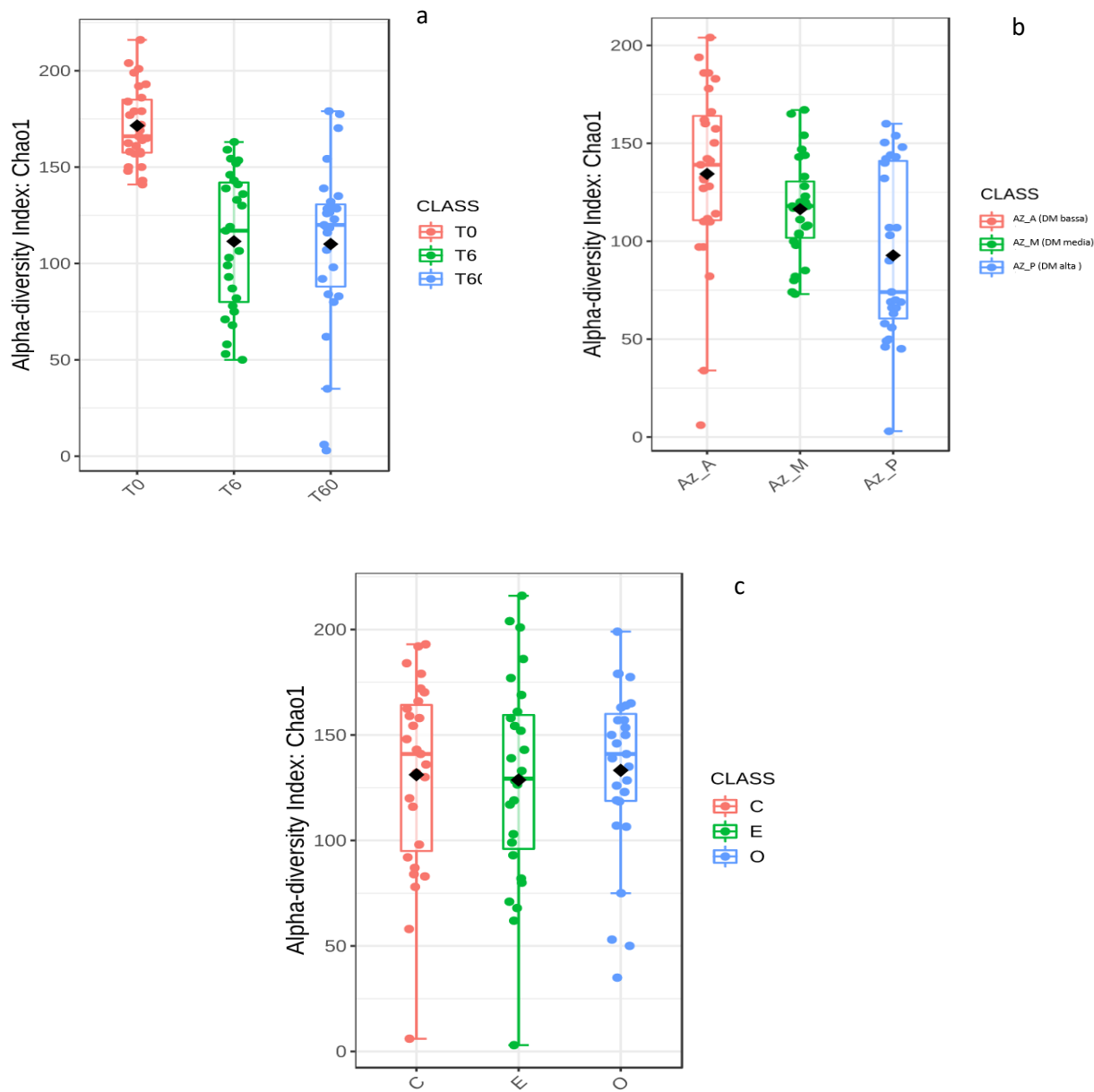


Figura 23 Alpha-diversity calcolata con la metrica Chao1 per la variabile (a) tempo (p -value $4.2954e-09$) (b) Azienda (DM) (p -value $0,0002$) e (c) tesi (p -value $0,9363$)

4.4.1 Generi più abbondanti in relazione alla tesi e al tempo

Dall'analisi dell'Alpha-diversity nei campioni sottoposti a diversi tempi di insilamento è emerso come la diversità fosse maggiore nei campioni del T0 rispetto a quella dei tempi 6 e 60. Nella figura 24 viene riportata l'abbondanza relativa dei diversi generi nelle tre tesi (controllo, eterofermentante e omofermentante) nei diversi tempi di insilamento (T0, T6 e T60) filtrando i 20 generi più abbondanti. Quello che per primo si nota è come la varietà di generi presenti nei campioni del T0 è maggiore di quella osservata nel T6 ma soprattutto nel T60 in cui vi è stata una stabilizzazione dei vari generi confermando il risultato ottenuto nell'Alpha-diversity. Il contributo delle tre diverse tesi (controllo, eterofermentante e omofermentante) sulla diversità dei generi al T0 è abbastanza trascurabile, come rilevato nell'analisi dell'Alpha-diversity (p-value 0,9363). Il genere maggiormente presente nei campioni del T0 è *Weissella spp.* e questo conferma i risultati ottenuti dal sequenziamento Sanger (figura 17) in cui i generi *Weissella*, *Leuconostoc* e *Levilactobacillus* sono stati tra i generi wild maggiormente isolati. Nel T6 si nota come in tutte e 3 le tesi i generi *Lattobacillus spp.*, *Pediococcus spp.* insieme a *Weissella spp.* sono i generi dominanti confermando quanto ottenuto dai dati del sequenziamento Sanger. Il T6 come già detto potrebbero corrispondere alla fase fermentativa principale in cui in ambiente anaerobio vi è la competizione dei LAB con i microorganismi epifiti anaerobi facoltativi (Pahlow et al., 2003). Le specie aerobie obbligate presenti nei campioni del T0 come ad esempio *Pseudomonas spp.* sono scomparse quasi del tutto nei campioni del T60. Nei campioni di controllo, a cui non era stata addizionato alcun inoculo, la fermentazione è stata guidata esclusivamente dalla flora anaerobia epifita e mostra nel T60 una maggiore presenza di specie del genere *Pantoea spp.* e *Serratia spp.* meno presenti nei campioni inoculati. Il campione inoculato con lo starter eterofermentante mostra una maggiore abbondanza di specie del genere *Lactobacillus spp.* rispetto ai campioni inoculati con lo starter omofermentante. Dal sequenziamento Sanger è risultato come gran parte delle colonie isolate dai campioni

eterofermentanti appartenesse alla specie starter *Lentilactobacillus buchneri* seguita da *Lactiplantibacillus plantarum* *Levilactobacillus brevis*.



Figura 24. Abbondanza relativa dei diversi generi nelle 3 tesi testate (Controllo, eterofermentante ed omofermentante) in relazione al tempo di insilamento

4.4.2 Generi più abbondanti in relazione alle diverse aziende (DM) e al tempo

Dai risultati dell'Alpha-diversity nei campioni raccolti nelle 3 diverse è emerso come questi presentassero differenze significative in termini di Richness (p-value 0,0002). È importante ribadire come i campioni raccolti nelle 3 diverse aziende oltre che per il diverso livello di sostanza secca (DM), differivano anche in termini di composizione vegetale: frumento quelli raccolti nelle aziende A ed M e miscuglio di frumento e avena quelli dell'azienda. Nella figura 25 viene analizzata l'abbondanza relativa dei vari generi nei campioni delle 3 diverse aziende in relazione ai 3 tempi di insilamento. Al T0 l'azienda M (DM media 34.8%) presenta una minore diversità di generi rispetto ai campioni delle altre aziende e questo è in accordo con i risultati dell'alpha-diversity (figura 23 b). I campioni raccolti nell'azienda M presentano una maggiore concentrazione iniziale di LAB del genere *Weissella spp.* tale specie, al termine del processo di insilamento (T60) è stata sostituita dall'aumento di LAB del genere *Lactobacillus spp.* suggerendo come il processo di fermentazione ed eventualmente gli

starter impiegati abbiano guidato la fermentazione verso la stabilizzazione delle specie inoculate. Nell'azienda A (DM bassa 31,2%) invece, al T0 l'abbondanza di specie era molto superiore rispetto ai campioni delle altre aziende e anche questo è in accordo con i risultati dell'alpha-diversity (figura 23b) il maggiore contenuto di umidità può avere favorito una maggiore diversità microbica. Nei campioni dell'azienda A vi è una prevalenza del genere *Weissella spp.* che anche in questo caso al termine della fermentazione (T60) ha lasciato spazio al genere *Lactobacillus spp.* Considerazioni diverse vengono fatte invece per l'azienda P (DM alta) in cui dalle conte microbiologiche delle colonie in MRSA era risultato come il livello di LAB iniziale (T0) era il più basso (5 Log CFU/g di LAB). Questo risultato può essere facilmente appurato osservando la diversità delle specie al T0 rispetto soprattutto alle altre due aziende in cui la concentrazione di LAB risulta maggiore. Un altro dato confermato tra lo studio della comunità microbica e l'analisi microbiologica riguarda come dalle analisi di quest'ultima è emerso che la stratificazione dei dati in base all'azienda P ha suggerito come questa condizione ha favorito la persistenza degli eterofermentanti (figura 13) mostrando al T60 il livello più alto di LAB (vicino a 9 Log CFU/g); infatti se si osservano i risultati del T60 si vede come nei campioni dell'azienda P il genere *Weissella spp.* dal metabolismo eterofermentativo, abbia dominato la fermentazione insieme al genere *Lactobacillus spp.* e in misura minore al genere *Pediococcus spp.* Il contributo di maggiore contenuto di DM nei campioni raccolti in questa azienda e la sua correlazione con la maggiore concentrazione di specie eterofermentanti può essere lo spunto per futuri studi. Nel T6 si nota come l'avvio del processo di fermentazione abbia favorito lo sviluppo dei LAB dei generi *Weissella spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.* Nei campioni dell'azienda P (DM alta) il genere wild *Weissella spp.* domina la fermentazione al T6 mentre al T60 il genere *Lactobacillus spp.* risulta essere quello dominante. Nell'azienda A (DM bassa) al T6 la fermentazione sembra essere dominata dai LAB del genere *Pediococcus spp.* anche in questo caso sostituiti al T60 con LAB del genere *Lactobacillus spp.* Al T60 i campioni della stessa azienda continuano a presentare una maggiore varietà dei taxa. Anche nell'azienda M (DM media), al T6 i LAB dominanti erano *Weissella spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.* e in questo caso al T60 vi è stata una maggiore prevalenza dei generi *Lactobacillus spp.* rispetto alle altre aziende. Questi risultati mostrano come la prevalenza dei diversi generi dei LAB a 6 giorni e a 60 giorni può essere influenzata dal contenuto di DM dell'insilato.

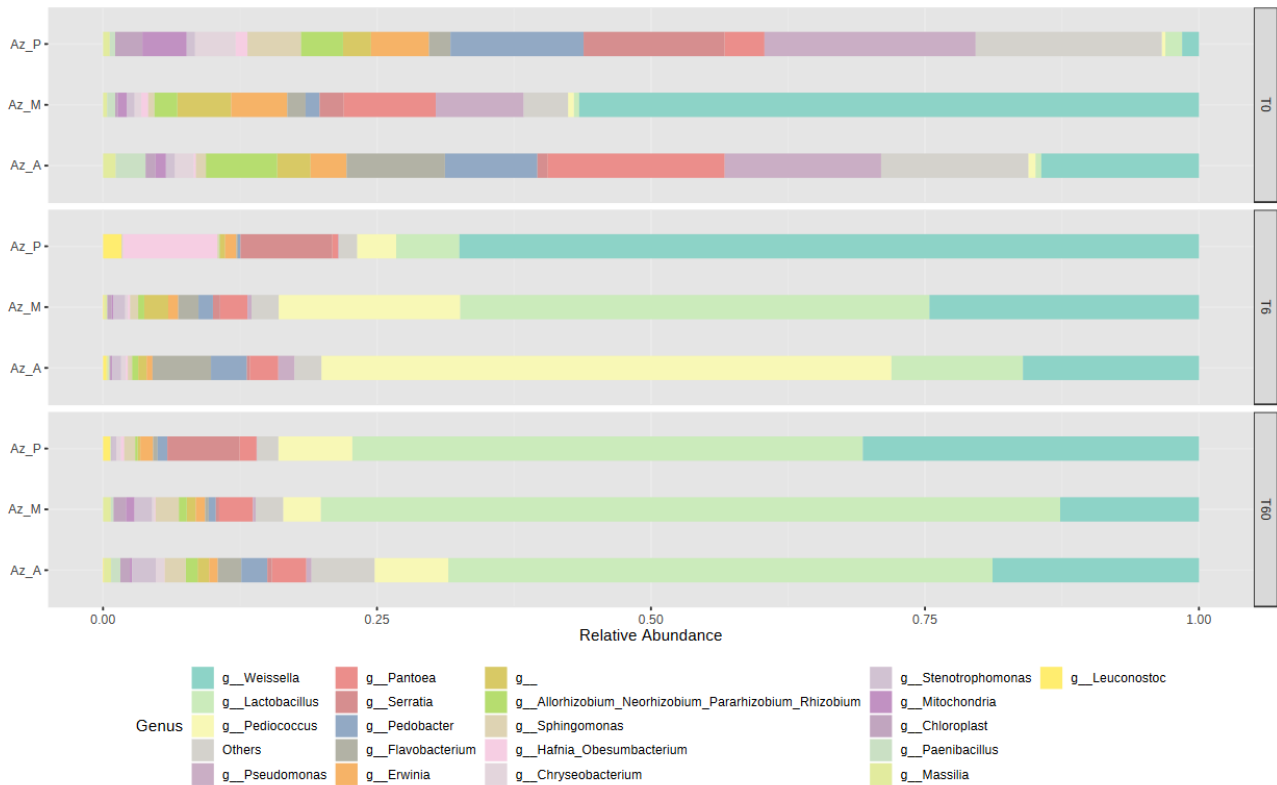


Figura 25. Abbondanza relativa dei campioni delle 3 aziende nei 3 diversi tempi

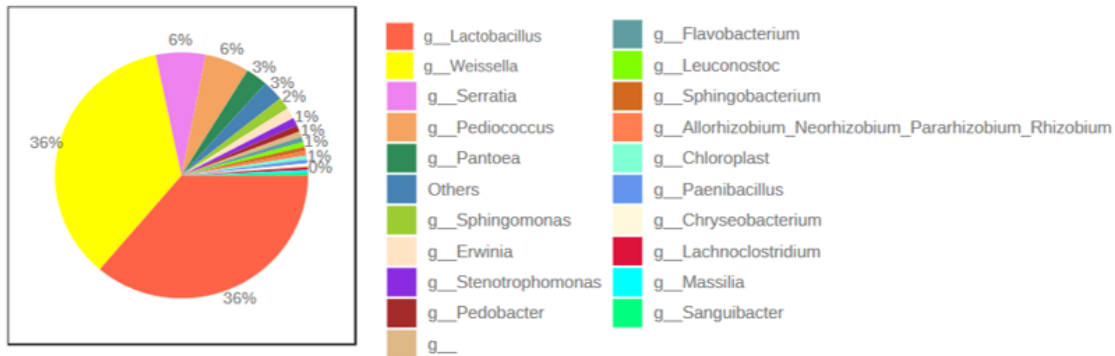
4.4.3 Principali considerazioni sull'evoluzione della comunità microbica nell'insilato finale (T60)

Nella figura 26 vengono riportati i risultati dell'analisi nel T60 per tutte e tre le tesi a confronto, filtrando per i 20 generi più abbondanti. Come si può vedere dal confronto con la figura 17 relativa al T0 il processo di fermentazione ha portato ad una stabilizzazione dei generi più dominanti. Partendo dal controllo si nota come i generi più abbondanti al termine della fermentazione siano *Weissella spp.* (35%) e *Lactobacillus spp.* (35%), altri generi non identificati dal sequenziamento, *Serratia spp.* (6%) e *Pediococcus spp.* (6%). Dai dati del sequenziamento Sanger per il controllo non erano state isolate e sequenziate specie appartenenti al genere *Weissella spp.* ma erano stati isolati ceppi appartenenti principalmente al genere *Levilactobacillus spp.* e *Lactiplantibacillus spp.* e quindi grazie all'analisi della comunità siamo in grado di individuare i principali generi autoctoni che hanno

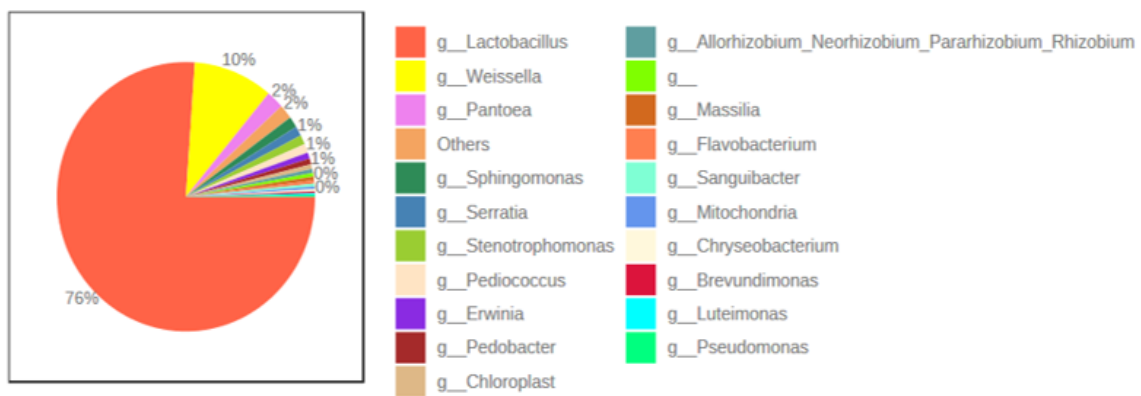
dominato la fermentazione. Nei campioni di controllo, come già ricordato, la fermentazione è stata guidata esclusivamente dalla flora anaerobia epifita e mostra nel T60 una maggiore presenza di specie anaerobie del genere *Pantoea spp* e *Serratia spp*. meno presenti nei campioni inoculati. *Serratia. spp* è un genere appartenente alla famiglia delle Enterobacteriacee ed è più abbondante nei campioni del controllo rispetto a quelli inoculati; questo può dipendere dal fatto che gli enterobatteri sono solitamente il secondo gruppo più numero della flora epifita attiva durante l'insilamento e competono con i LAB durante tutto il processo di fermentazione producendo principalmente acido acetico (*Pahlow et al., 2003*). Quindi l'aggiunta degli inoculi ha favorito nei campioni trattati la competizione dei LAB rispetto alla flora anaerobia epifita. Le specie aerobie obbligate presenti nei campioni del T0 come ad esempio *Pseudomonas spp*. sono scomparse quasi del tutto nei campioni del T60 e questo è del tutto comprensibile visto l'ambiente anaerobio che si crea durante l'insilamento. Per quanto riguarda il campione omofermentante anche qui la fermentazione sembra essere in gran parte dominata (48%) dal genere *Lactobacillus spp*. che includeva nella vecchia tassonomia anche i nuovi generi *Lactiplantibacillus spp.* e *Levilactobacillus spp.*, seguito da *Weissella spp.* (21%), altro genere non identificato, e *Pediococcus spp*. Rispetto al sequenziamento Sanger in cui non erano state isolate colonie appartenenti ai generi *Pediococcus spp.* e *Enterococcus spp* nonostante fossero due specie presenti nello starter (*Pediococcus pentosaceus* ed *Enterococcus faecium*) con l'approccio di metabarcoding viene rilevata la presenza del genere *Pediococcus spp.* (10%) e solo al 1% viene rilevato il genere *Enterococcus spp* confermando quanto affermato da *Muck et al., 2007*. Questo ci fornisce un'ulteriore prova di come i due approcci di analisi forniscano una visione complementare e più completa della biodiversità. Nei campioni inoculati con lo starter eterofermentante la fermentazione è stata dominata da specie del genere *Lactobacillus*, che dalla nuova riorganizzazione tassonomica sappiamo includere il genere *Lentilactobacillus* e questo è stato confermato anche dal sequenziamento Sanger. L'utilizzo dell'inoculo eterofermentante sembra mostrare una maggiore abbondanza di specie del genere *Lactobacillus spp.* rispetto ai campioni inoculati con lo starter omofermentante al termine del processo di fermentazione. Dal sequenziamento Sanger è risultato come gran parte delle colonie isolate dai campioni eterofermentanti appartenesse alla specie starter *Lentilactobacillus buchneri* seguita da *Lactiplantibacillus plantarum* *Levilactobacillus brevis*. Per avere un'idea più specifica della varietà di specie presenti nel campione inoculato con lo starter eterofermentante al termine del periodo di insilamento (T60), pur conoscendo i limiti dell'analisi della comunità microbica mediante

NGS al livello tassonomico della specie, si è deciso di esplorare la varietà di specie e di visualizzarla attraverso un grafico a torta (figura 27). Come si può vedere dal grafico in cui è indicata l'abbondanza in percentuale dei campioni eterofermentanti al termine del periodo di insilamento, più del 50% (52%) delle specie è rappresentata da *Lentilactobacillus buchneri*. È importante sottolineare che il software MicrobiomeAnalyst riporta la specie con il nome *Lactobacillus buchneri* poiché evidentemente non è ancora stato aggiornato con la riclassificazione tassonomica dei LAB eseguita da Zheng et al., nel 2020 che ha visto la creazione di 23 nuovi tra cui il *Lentilactobacillus*. La dominanza di *Lentilactobacillus buchneri* negli insilati inoculati con questo batterio è in accordo con quanto descritto da (Schmidt et al., 2009) in cui la popolazione di *Lentilactobacillus buchneri* era quella dominante in insilati di erba medica inoculati con questo starter a 45, 90 e 180 giorni di insilamento. Nella figura 27 si può vedere come un'altra specie presente al 36% nei campioni eterofermentanti non è stata identificata dal sequenziamento NGS per i limiti della tecnologia di cui sopra discusso; si potrebbe ipotizzare dai dati del sequenziamento Sanger dei campioni del T60 (figura 18) che si tratti di *Lactiplantibacillus plantarum* le cui colonie erano state isolate e sequenziate da questi stessi campioni.

Controllo T60



Eterofermentante T60



Omofermentante T60

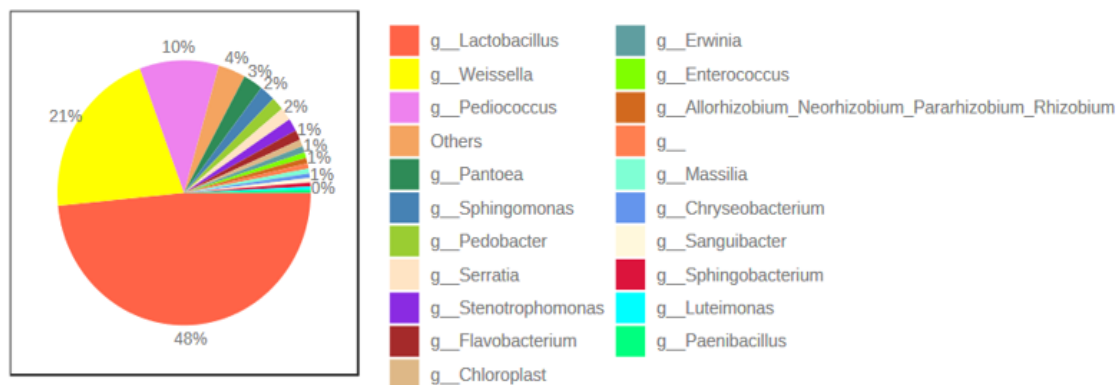


Figura 26. Abbondanza dei diversi generi al T60 a confronto tra le tre tesi

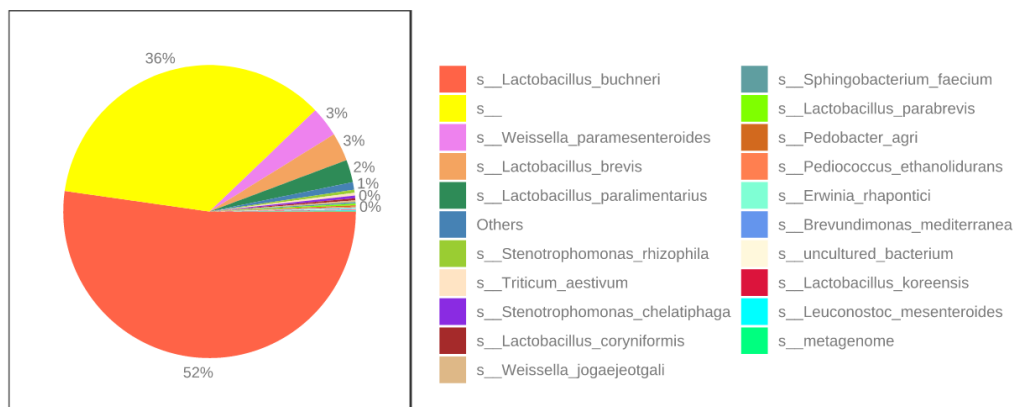


Figura 27. Pie-chart che mostra l'abbondanza delle diverse specie nei campioni inoculati con lo starter eterofermentante al T60

4.6 Influenza dell'utilizzo dei differenti starter sul pH al termine della fermentazione

La misurazione del pH è uno tra i metodi più comunemente utilizzati per valutare la fermentazione dell'insilato (Kung et al., 2018). I LAB sono i microorganismi principalmente responsabili della riduzione del pH e quindi della conservazione dell'insilato; in genere un insilato ben conservato ha valori di pH inferiori a 4,2 (Carvalho et al., 2020). Come descritto nella sezione di materiali e metodi, per i campioni sottoposti ad insilamento per 6 e 60 giorni sono stati calcolati i valori di pH all'apertura del silo. Tali valori di pH sono stati mediati ed utilizzati per classificare i campioni sulla base del loro livello di acidità in tre categorie: High > 4,22; Medium 4,01-4,22; Low < 4,01. L'utilizzo di inoculi omofermentanti riduce rapidamente il pH per via della maggiore produzione di acido lattico rispetto agli altri acidi organici (Carvalho et al., 2020). È stato quindi valutato come l'utilizzo di uno o l'altro starter influenzasse il pH rispetto al controllo e attraverso la valutazione dell'abbondanza dei diversi generi in relazione al pH, si è indagato sulla misura in cui questi potessero essere correlati ad un aumento o riduzione del pH.

4.6.1 Risultati T60 per tesi

Nella figura 28 viene valutata l'abbondanza dei generi nelle tre tesi (controllo, eterofermentante ed omofermentante) in relazione al pH al termine del periodo di insilamento (T60). Come prima osservazione si può vedere come i campioni inoculati con lo starter omofermentante al T60 presentavano livelli di pH bassi (< 4,01) e nessun campione ha mostrato livelli di medi (pH 4,01-4,22) al contrario di quanto si osserva invece per i campioni inoculati con lo starter eterofermentante ed il controllo. Nei campioni di controllo che presentano livelli di pH medi (4,01-4,22) la fermentazione al T60 risulta essere dominata principalmente dai generi epifiti *Weissella spp* e *Lactobacillus spp*, ma anche *Pediococcus spp* e *Serratia spp*. mentre in quelli che presentano bassi livelli Low < 4,01 il genere *Lactobacillus spp* prevale su *Weissella spp*. Questo potrebbe dipendere dal fatto che i generi *Weissella spp* sono eterofermentanti obbligati e quindi oltre all'acido lattico producono anche acido acetico come prodotti finali del metabolismo degli zuccheri, e questo contribuisce meno alla riduzione del pH poiché ha meno potere acidificante rispetto all'acido lattico. Nei campioni con valori medi di pH inoculati con lo starter eterofermentante, che ricordiamo conteneva la specie *Lentilactobacillus buchneri*, la fermentazione è stata dominata dai generi *Lactobacillus spp*. Confrontando questi risultati con quelli ottenuti dal sequenziamento Sanger (figura 19) si può affermare che si tratta in gran parte della specie *Lentilactobacillus buchneri* che converte lentamente l'acido lattico in acido acetico dopo il periodo di fermentazione attiva, aumentando il pH e migliorando la stabilità aerobica dell'insilato finale. (Muck et al., 2018). Nei campioni a pH basso invece, vi è una maggiore presenza di generi autoctoni *Weissella spp* *Pediococcus spp* e *Serratia spp*. che potrebbero aver contribuito al raggiungimento di livelli più bassi di pH. I campioni inoculati con lo starter omofermentante hanno raggiunto tutti valori bassi di pH (< 4,01) e ciò è legato alla maggiore produzione di acido lattico, il quale contribuisce maggiormente alla diminuzione del pH perché è circa 10-12 volte più forte degli altri acidi principali. (Kung et al., 2018) Pertanto questo risultato è coerente nello stabilire che l'utilizzo di starter omofermentante ha portato all'ottenimento di bassi valori di pH in tutti i campioni.

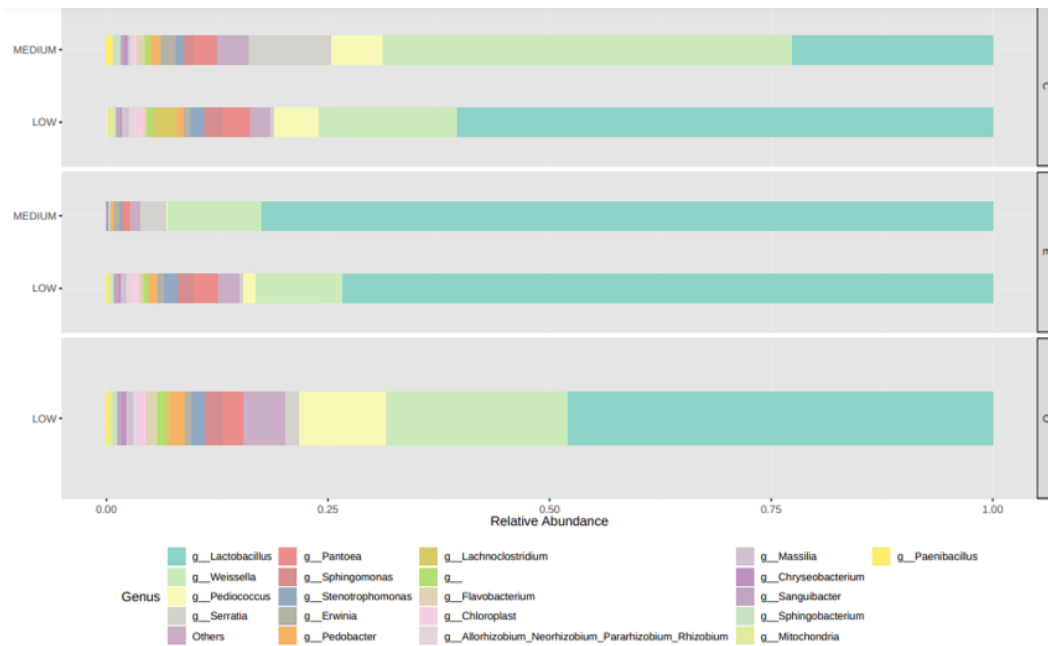


Figura 28. Abbondanza relativa dei diversi generi nelle 3 tesi (Controllo, eterofermentante ed omofermentante) in relazione al pH al T60

4.6.2 Risultati T60 per Azienda (DM)

Nella figura 29 viene valutata l'abbondanza dei generi nelle tre aziende (A, M e P) in relazione al pH al termine del periodo di insilamento (T60). È importante ribadire che la principale differenza tra i campioni raccolti nelle 3 aziende sia riferita al diverso contenuto in termini di sostanza secca al momento del raccolto, per tanto, come già detto, i campioni provenienti dalle 3 aziende sono stati classificati in tre categorie: Azienda P DM alta (43.4%); Azienda A DM bassa (31,2%) e Azienda M DM media (34.8%) Dalla figura 29 si può notare come i campioni dell'azienda M che presentavano un contenuto di sostanza secca medio del 34.8% al termine dell'insilamento presentavano tutti bassi livelli di pH (< 4,01) e una maggiore presenza del genere *Lactobacillus spp.* La correlazione tra contenuto di DM al raccolto e pH finale è stata descritta da Kung et al., 2018 in cui è stato visto come gli insilati di legumi con livelli di DM <30-35% raggiungessero al termine della fermentazione pH inferiori rispetto a quelli raccolti a maggiore contenuto di sostanza secca. È probabile pertanto, che l'acqua metabolica disponibile per la crescita dei LAB diventa un fattore limitante per il loro metabolismo con l'aumento del DM dell'insilato. (Kung et al., 2018). Questo dato potrebbe essere confermato da questi risultati. Gli insilati raccolti nell'azienda P ad alto contenuto di sostanza secca (43.4%) mostrano al termine della fermentazione una prevalenza non solo di *Lactobacillus spp.* ma

anche di *Weissella spp* e *Pediococcus spp*. *Pediococcus spp* è maggiormente presente negli insilati della stessa azienda che presentano pH bassi mentre nei campioni raccolti nelle altre aziende i campioni che presentavano pH bassi vedevano il genere *Lactobacillus spp*. dominare. Questo può suggerire come la produzione di acido lattico da parte di *Pediococcus spp* possa contribuire alla riduzione del pH negli insilati che presentano alto contenuto di DM. I campioni raccolti nell'azienda A che avevano un contenuto basso di DM (31,2%) presentano anch'essi una prevalenza dei generi *Lactobacillus spp*. *Weissella spp* e *Pediococcus spp* più evidente nei campioni con pH medio mentre in quelli a pH basso il genere *Lactobacillus spp* è quello più dominante.



Figura 29. Abbondanza relativa dei diversi generi nelle 3 Aziende (A, M e P) in relazione al pH al T60

5. Conclusioni

L'utilizzo dei due diversi metodi, coltura-dipendente e coltura indipendente ha permesso di ottenere informazioni più complete sull'evoluzione della comunità microbica dall'inizio alla fine del processo di fermentazione. I risultati ottenuti dai due differenti approcci si sono rivelati coerenti e di supporto l'uno con l'altro consentendo di trarre conclusioni più esaustive e complete sull'evoluzione della comunità microbica in relazione ai trattamenti con i due starter. Un primo dato confermato da entrambi gli approcci è che vi è stata una progressiva riduzione della varietà dei taxa dall'inizio alla fine del processo di insilamento; la β -diversità tra i campioni del T0 e quelli del T6 e T60 è risultata evidente così come l' α -diversità nei campioni del T0 è risultata la maggiore. Questo conferma come il processo di fermentazione ha contribuito alla selezione delle specie e alla riduzione della biodiversità in risposta ai cambiamenti chimico-fisici dell'insilato primi fra tutti l'assenza di O₂ e la riduzione del pH. I campioni inoculati con lo starter eterofermentante hanno mostrato al termine dell'insilamento la maggiore prevalenza di specie appartenenti al genere *Lactobacillus* spp. e questo risultato è stato confermato oltre che dai dati del sequenziamento Sanger e da quelli NGS anche dalle conte su terreno MRSA. Questo suggerisce come lo starter eterofermentante (*Lentilactobacillus buchneri*) si sia adattato meglio alla matrice sopravvivendo fino al termine dell'insilamento. La maggiore presenza di specie anaerobiche epifite nei campioni di controllo rispetto ai campioni trattati al termine dell'insilamento dimostra che l'aggiunta degli inoculi ha favorito la competizione dei LAB rispetto alla flora anaerobia autoctona durante il processo di fermentazione. La classificazione dei campioni raccolti nelle tre diverse aziende sulla base del loro contenuto di sostanza secca (DM alta, media e bassa) ha permesso di valutare l'impatto di quest'ultima sull'evoluzione della comunità microbica e sull'acidificazione della massa insilata. I campioni ad alto contenuto di sostanza secca (DM 43,4%) hanno mostrato maggiore β -diversità rispetto a quelli con contenuto basso (DM 31,2%) e medio (DM 34,8%), mentre livelli maggiori di α -diversità hanno caratterizzato i campioni a contenuto basso di sostanza secca. I campioni ad alto contenuto di sostanza secca hanno mostrato però una maggiore persistenza di LAB eterofermentanti al termine della fermentazione suggerendo come la prevalenza dei diversi generi dei LAB a 6 giorni e a 60 giorni può essere influenzata dal contenuto di DM dell'insilato. Il rilevamento della specie *Enterococcus faecium* componente dello starter omofermentante in bassa percentuale (1%) conferma quanto presente in letteratura secondo cui le specie di *Enterococcus*

spp. da sole non sono in grado di migliorare la qualità dell'insilato. L'utilizzo degli starter ha influenzato l'acidificazione della massa vegetale, in particolare tutti i campioni trattati con lo starter omofermentante hanno raggiunto valori di pH < 4,01 confermando i dati della letteratura sul maggior potere acidificante dei LAB omofermentanti. Gli stessi valori di pH sono stati raggiunti dai campioni a basso contenuto di sostanza secca suggerendo anche qui una possibile correlazione. Ulteriori studi saranno necessari per approfondire l'influenza dei due starter sulla produzione di metaboliti di interesse primi fra tutti gli acidi lattico e acetico quest'ultimo correlato alla stabilità aerobica del prodotto.

6. Bibliografia

1. Adams MR, Marteau P. (1995). On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol.* 27 (2-3):263-4. doi: 10.1016/0168-1605(95)00067
2. Beuchat LR. (1993) Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int J Food Microbiol.*;19(1):1-14. doi:10.1016/0168-1605(93)90119-2
3. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Guéguen M. (2007). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International journal of food microbiology.* 126(3):278-85. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015
4. Biolife Italiana Srl, TRYPTIC GLUCOSE YEAST AGAR (PLATE COUNT AGAR) (STANDARD METHODS AGAR) (PDF)
5. Capruso L (2016). I probiotici. *Recenti Prog Med.*, 107(6):267-277 .
6. Carvalho, B., Sales, G., Schwan, R., & Ávila, C. (2020). Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072.*
7. Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J (2020). Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc.* 15(3):799-821. doi: 10.1038/s41596-019-0264-1
8. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, Rooney AP, Yi H, Xu XW, De Meyer S, Trujillo ME (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68(1):461-466. doi: 10.1099/ijsem.0.002516.
9. De Man J. C, Rogosa M , Elisabeth Sharpe M (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130-135.
10. Duar RM, Lin XB, Zheng J, Martino ME, Grenier T, Pérez-Muñoz ME, Leulier F, Gänzle M, Walter J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol Rev.* doi: 10.1093/femsre/fux030
11. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman RM, Ravel J (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome*, 24;2(1):6. doi: 10.1186/2049-2618-2-6
12. Ferrero F, Tabacco, E Borreani. G (2020). Insilamento: conservazione efficiente e naturale di foraggi. *L'Informatore Agrario.* N14/2020
13. Gänzle M.G (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science.*
14. Giorgi F, Lionello. P. (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob. Planet. Change.* <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2007.09.005>.

15. Holzapfel W.H, Wood J.B.B (2014). *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*.
16. Inglin R.C, Meile L, Stevens MJA (2018). Clustering of Pan-and Core-genome of *Lactobacillus* provides Novel Evolutionary Insights for Differentiation. *BMC Genomics* , 19:284. doi: 10.1186/s12864-018-4601-5
17. Justé A, Thomma BP, Lievens B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol*. doi: 10.1016/j.fm.2008.04.009
18. Kircher M, Kelso J. (2010). High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays*. doi: 10.1002/bies.200900181.
19. Klaenhammer, T. R., Altermann, E., Pfeiler, E., Buck, B. L., Goh, Y.-J., O'Flaherty, S., Duong, T. (2008) Functional Genomics of Probiotic *Lactobacilli*. *Journal of Clinical Gastroenterology*.
20. Krooneman J, Faber F, Alderkamp AC, Elferink SJHWO, Driehuis F, Cleenwerck I, Swings J, Gottschal JC, Vancanneyt M. (2002). *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi: 10.1099/00207713-52-2-639.
21. Kung L, Shaver R.D, Grant. R.J, Schmidt R.J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J Dairy Sci*. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>.
22. Lahtinen S, Ouwehand A.C, Salminen S, Von Wright, A. (Eds.). (2012). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition (4th ed.)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11503>
23. Larena I, Salazar O, González V, Julián M.C, Rubio V. (1999). Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *J. Biotechnol.*, pp. 187-194
24. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T. et al., (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 17; 103(42):15611-6. doi: 10.1073/pnas.0607117103.
25. Martino ME, Bayjanov JR, Caffrey BE, Wels M, Joncour P, Hughes S, Gillet B, Kleerebezem M, van Hijum SA, Leulier F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environ Microbiol*. 18(12):4974-4989. doi: 10.1111/1462-2920.13455
26. McAllister TA, Dunière L, Drouin P, Xu S, Wang Y, Munns K, Zaheer R (2018). Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *J Dairy Sci*. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>

27. Migliorati, Boselli L, Pirlo G, Moschini M, Masoero F. (2017). Corn silage replacement with barley silage in dairy cows' diet does not change milk quality, cheese quality and yield. *J. Sci. Food Agric.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.8190>
28. Muck R, Kung L.Jr (2007). Silage production. *Forages: The Science of Grassland Agriculture.*
29. Muck RE, Nadeau EMG, McAllister TA, Contreras-Govea FE, Santos MC, Kung L Jr. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science.* doi: 10.3168/jds.2017-13839
30. Oliveira A, S, Weinberg Z.G, Ogunade I.M, Cervantes A.A.P, Arriola K.G, Jiang Y, Kim D, Li X, Gonçalves M.C.M et al.,(2017). Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science.* <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11815>
31. Orla-Jensen, S. (1919). The Latic Acid Bacteria. *Andr. Fred. Host and Son,.*
32. Pahlow G, Muck. R.E, Driehuis. F, Oude Elferink. S. J. W. H, Spoelstra. S. F (2003). Microbiology of Ensiling. In *Silage Science and Technology.* <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>
33. Qiao N, Wittouck S, Mattarelli P, Zheng J, Lebeer S, Gänzle M.G (2022). After the storm— Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae. *JDS Communications*, 222-227. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>
34. Rumi S. (2015). Fieno vS Insilato: I punti critici della produzione del foraggio, dalla tecnica ai costi, secondo le esperienze di campo dei coltivatori associati alla Comazoo di Montichiari. *Informatore Zootecnico.*
35. Sanger F, Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
36. Schmidt RJ, Hu W, Mills JA, Kung L Jr. (2009). The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation *J Dairy Sci.* doi: 10.3168/jds.2008-1701.
37. Semenov, M. V. (2021). Metabarcoding and Metagenomics in Soil Ecology Research: Achievements, Challenges, and Prospects. *Biology Bulletin Reviews.*
38. Istituto Nazionale di Statistica (accessed on May 9, 2022). Available online: http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCSP_LATTE.
39. Sun Z, Harris HM, McCann A, Guo C, Argimón S, Zhang W, Yang X, Jeffery IB, Cooney JC, Kagawa TF, Liu W, Song Y, Salvetti E et al., (2015). Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun.* , 29;6:8322. doi: 10.1038/ncomms9322.

40. Schillinger U, Holzapel W.H. (2003). Chapter 8 Culture media for lactic acid bacteria. In *Progress in Industrial Microbiology*. (p. 127–140).
41. Zheng J, Ruan L, Sun M, Gänzle M. (2015). Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. *Appl Environ Microbiol*. doi: 10.1128/AEM.02116-15.
42. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

Materiali supplementari

N Campione	Tesi	Azienda	Tempo	Campione
1	controllo	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
2	controllo	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
3	controllo	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
4	eterofermentante	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
5	eterofermentante	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
6	eterofermentante	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
7	omofermentante	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
8	omofermentante	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
9	omofermentante	Az. P	T0	miscuglio frumento e avena
10	controllo	Az. A	T0	frumento
11	controllo	Az. A	T0	frumento
12	controllo	Az. A	T0	frumento
13	eterofermentante	Az. A	T0	frumento
14	eterofermentante	Az. A	T0	frumento
15	eterofermentante	Az. A	T0	frumento
16	omofermentante	Az. A	T0	frumento
17	omofermentante	Az. A	T0	frumento
18	omofermentante	Az. A	T0	frumento
19	controllo	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
20	controllo	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
21	controllo	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
22	eterofermentante 1	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
23	eterofermentante 2	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
24	eterofermentante 3	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
25	omofermentante	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
26	omofermentante	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
27	omofermentante	Az. P	T6	miscuglio frumento e avena
28	controllo	Az. M	T0	frumento
29	controllo	Az. M	T0	frumento
30	controllo	Az. M	T0	frumento
31	eterofermentante	Az. M	T0	frumento
32	eterofermentante	Az. M	T0	frumento
33	eterofermentante	Az. M	T0	frumento
34	omofermentante	Az. M	T0	frumento
35	omofermentante	Az. M	T0	frumento
36	omofermentante	Az. M	T0	frumento
37	controllo	Az. A	T6	frumento
38	controllo	Az. A	T6	frumento
39	controllo	Az. A	T6	frumento

40	eterofermentante	Az. A	T6	frumento
41	eterofermentante	Az. A	T6	frumento
42	eterofermentante	Az. A	T6	frumento
43	omofermentante	Az. A	T6	frumento
44	omofermentante	Az. A	T6	frumento
45	omofermentante	Az. A	T6	frumento
46	controllo	Az. M	T6	frumento
47	controllo	Az. M	T6	frumento
48	controllo	Az. M	T6	frumento
49	eterofermentante	Az. M	T6	frumento
50	eterofermentante	Az. M	T6	frumento
51	eterofermentante	Az. M	T6	frumento
52	omofermentante	Az. M	T6	frumento
53	omofermentante	Az. M	T6	frumento
54	omofermentante	Az. M	T6	frumento
55	controllo	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
56	controllo	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
57	controllo	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
58	eterofermentante	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
59	eterofermentante	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
60	eterofermentante	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
61	omofermentante	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
62	omofermentante	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
63	omofermentante	Az. P	T60	miscuglio frumento e avena
64	controllo	Az. A	T60	frumento
65	controllo	Az. A	T60	frumento
66	controllo	Az. A	T60	frumento
67	eterofermentante	Az. A	T60	frumento
68	eterofermentante	Az. A	T60	frumento
69	eterofermentante	Az. A	T60	frumento
70	omofermentante	Az. A	T60	frumento
71	omofermentante	Az. A	T60	frumento
72	omofermentante	Az. A	T60	frumento
73	controllo	Az. M	T60	frumento
74	controllo	Az. M	T60	frumento
75	controllo	Az. M	T60	frumento
76	eterofermentante	Az. M	T60	frumento
77	eterofermentante	Az. M	T60	frumento
78	eterofermentante	Az. M	T60	frumento
79	omofermentante	Az. M	T60	frumento
80	omofermentante	Az. M	T60	frumento
81	omofermentante	Az. M	T60	frumento

Tabella S1 Elenco degli 81 campioni analizzati