



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di Laurea magistrale in  
Biotecnologie per l'Alimentazione

APPLICAZIONE DELLA TECNICA *NGS* PER  
LA CARATTERIZZAZIONE DEL  
MICROBIOTA DI BRESAOLA DURANTE IL  
PROCESSO PRODUTTIVO

Relatore

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatore

Dott.ssa Maria Angela Frustoli

Laureanda

Bianca Maria Melegari

Matricola n. 2055248

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



## RIASSUNTO

La Bresaola della Valtellina è il risultato del metodo di lavorazione sancito dal Disciplinare di produzione. Il prodotto finito risente dell'influenza degli ambienti di lavorazione che possono esercitare una selezione sul microbiota tipico, che può variare a seconda delle caratteristiche delle materie prime, delle condizioni ambientali ed ecologiche, della lavorazione e della stagionatura.

Oggetto del presente lavoro di tesi è lo studio del microbiota superficiale di 48 campioni, provenienti da bresaole di 3 diversi stabilimenti, rappresentativi del metodo di lavorazione.

L'identificazione accurata di tale microbiota viene effettuata tramite la tecnologia molecolare di *Next Generation Sequencing S5* di *Ion Torrent*, sequenziando specifiche regioni di DNA contenute all'interno del gene 16S. Il tutto viene svolto a partire dall'estrazione del DNA totale dei campioni; a seguire vengono realizzati manualmente i passaggi di preparazione degli ampliconi, di preparazione e determinazione della concentrazione della libreria; infine sfruttando il sistema automatizzato *Ion Chef* di *Ion Torrent* viene realizzata un'amplificazione clonale e il caricamento dei chip da inserire nello strumento successivo. L'ultimo passaggio prevede il sequenziamento delle librerie caricate sui chip, per mezzo dello strumento *Ion S5*. I dati ottenuti vengono rielaborati con il software Excel e vengono realizzate le visualizzazioni grafiche relative alle abbondanze relative percentuali per ogni campione. Sono stati valutati, inoltre, gli indici di *Alpha* e *Beta-diversity* al fine di comprendere quale fosse la diversità all'interno dei singoli campioni e tra i campioni stessi.

I risultati ottenuti hanno messo in luce come, anche partendo da materie prime differenti e con un microbiota caratteristico molto variegato, il processo produttivo sia in grado di portare ad una omogenizzazione della diversità microbica.

## ABSTRACT

Bresaola della Valtellina is the result of the processing method enshrined in the Production Regulations. The finished product is affected by the influence of the processing environments, which can exert a selection on the typical microbiota, which can vary depending on the characteristics of raw materials, environmental and ecological conditions, processing and aging.

The subject of this thesis work is the study of the surface microbiota of 48 samples, from 3 different factories, representative of the processing method.

Accurate identification of this microbiota is carried out by *Ion Torrent's Next Generation Sequencing S5* molecular technology, sequencing specific DNA regions contained within the 16S gene. This is done starting with the extraction of total DNA from the samples; followed by manual steps of amplicon preparation, preparation and determination of library concentration; and finally by taking advantage of *Ion Torrent's* automated *Ion Chef system*, clonal amplification and loading of chips for insertion into the next instrument is performed. The last step involves sequencing, of the libraries loaded onto the chips, by means of the *Ion S5 instrument*. The data obtained are reprocessed using Excel software, and graphical displays of relative percent abundances for each sample are made. *Alpha* and *Beta-diversity* indices were also evaluated in order to understand what the diversity was within and among individual samples.

The results obtained highlighted how, even starting from different raw materials and with a highly varied characteristic microbiota, the production process is able to bring about a homogenization of microbial diversity.

# INDICE

1	INTRODUZIONE.....	0
1.1	La Bresaola.....	1
1.1.1	Il processo produttivo.....	2
1.1.2	Microbiologia delle carni bovine fresche e stagionate .....	5
1.2	Il sequenziamento del DNA.....	8
1.2.1	I sequenziatori <i>NGS</i> .....	10
1.2.2	Le applicazioni dell' <i>NGS</i> .....	13
1.3	Il gene 16s rDNA.....	14
1.3.1	Esempi di 16S amplicon sequencing in prodotti carnei .....	17
2	SCOPO DELLA TESI.....	18
3	MATERIALI E METODI.....	20
3.1	Selezione delle Bresaole.....	21
3.2	Preparazione dei campioni di partenza .....	22
3.3	Estrazione del DNA.....	23
3.4	Preparazione degli ampliconi .....	24
3.5	Preparazione della libreria .....	26
3.6	Determinazione della concentrazione della libreria .....	28
3.7	Amplificazione clonale e caricamento dei chip .....	30
3.8	Sequenziamento.....	35
3.9	Analisi dei dati di sequenziamento e rielaborazione successiva	37
4	RISULTATI E DISCUSSIONI .....	43
4.1	Materia prima .....	48

4.2	Fine salagione .....	58
4.3	Fine asciugamento.....	62
4.4	Fine stagionatura .....	65
4.5	Valutazione dell'andamento del microbiota durante il processo produttivo .....	69
5	CONCLUSIONI .....	74
6	BIBLIOGRAFIA .....	77

# **1 INTRODUZIONE**

## 1.1 La Bresaola

La Bresaola è un salume crudo stagionato a pezzo intero. È uno dei salumi della tradizione gastronomica italiana, apprezzato per le sue caratteristiche nutrizionali, quali l'elevato contenuto proteico, la bassa quantità di grassi e sali e il ridotto apporto calorico; è inoltre un prodotto naturalmente ricco di vitamina B1, B6 e B12 e di sali minerali, come ferro, zinco, fosforo e potassio.

Si presenta con una colorazione di un rosso uniforme e può essere rilevata la presenza di una leggera marezzatura di grasso di colore bianco, la consistenza è morbida e compatta, mentre l'odore richiama la concia usata per la salagione ([www.bresaolavaltellina.it](http://www.bresaolavaltellina.it)) (Cantoni & Marzano, 2007; Ballarini, 1997).

Il termine bresaola è di origine incerta; secondo una prima interpretazione, potrebbe derivare dalla voce germanica "brasa", brace, poichè anticamente, per riscaldare e deumidificare l'aria dei locali di stagionatura, venivano utilizzati dei braceri. Il suffisso "saola", invece, può ricondursi al latino "sal, salis" dovuto all'utilizzo del sale nella conservazione del prodotto.

Secondo altri ricercatori, il nome bresaola potrebbe derivare dal dialettismo locale "brisa", che indica una ghiandola dei bovini fortemente salata e ancor'oggi, con l'espressione "salaa come la brisa", si intende la carne molto salata (Cantoni, 2010).

Le prime testimonianze relative alla produzione della bresaola risalgono al XV secolo, ma l'origine del salume è senz'altro antecedente, legata alla tradizionale conservazione del cibo attraverso la salagione.

Per la produzione della Bresaola della Valtellina vengono utilizzati tagli della coscia di bovini di razze selezionate e di età compresa tra i 18 mesi e i 4 anni. La materia prima utilizzata è per la maggior parte proveniente da allevamenti Europei e Sud-Americani; vista la provenienza la materia prima può essere congelata per poi essere scongelata al momento della lavorazione.

Per la produzione della Bresaola della Valtellina IGP possono essere utilizzati esclusivamente i 5 tagli muscolari più pregiati della coscia bovina ([www.bresaolavaltellina.it](http://www.bresaolavaltellina.it)):

- punta d'anca: corrisponde alla parte della fesa privata del muscolo adduttore;
- fesa: comprende il muscolo retto interno, il muscolo adduttore e il muscolo semimembranoso;



- sottofesa: corrisponde al muscolo lungo vasto;
- magatello: corrisponde al muscolo semitendinoso;
- sottosso: corrisponde al muscolo retto anteriore, al muscolo vasto esterno, interno e intermedio.

Tuttora sono prodotte diverse tipologie di bresaola che si differenziano per la tipologia di carne utilizzata, la più diffusa delle quali è però la bresaola bovina.

### 1.1.1 Il processo produttivo

La Bresaola della Valtellina è una produzione tipica del Nord Italia, ma solamente quella prodotta all'interno di una specifica area geografica, la provincia di Sondrio, ha ottenuto il riconoscimento comunitario di "Indicazione Geografica Protetta - IGP" a norma del Reg. (CE) 2081/92, con il Reg. (CE) n. 1263/96 dell'1 luglio 1996. Il relativo Disciplinare di Produzione è stato recepito nell'ordinamento italiano con decreto 23 dicembre 1998 del Ministero delle Politiche Agricole e Agroindustriali Nazionali. Ad oggi la produzione della Bresaola della Valtellina, anche quella non IGP, segue i dettami di tale Disciplinare.

Secondo quest'ultimo, le masse muscolari devono essere ispezionate al fine di selezionare i pezzi idonei ad essere inviati alla prima fase di lavorazione, sono scartate le parti eccessivamente mazzate e di colore non conforme. Le parti selezionate vengono quindi sottoposte a rifilatura, effettuata con lo scopo di asportare il grasso e le parti tendinose esterne senza incidere la polpa, perché essa forma integralmente e singolarmente i pezzi da lavorare successivamente (Figura 1).



*Figura 1 .Taglio di punta d'anca al termine del processo di rifilatura.*

La fase seguente è quella della salagione "a secco", che avviene a temperature di refrigerazione in vasche di acciaio dette vagonetti o marne in cui la carne viene

cosparsa con una miscela di cloruro di sodio, spezie, piante aromatiche, aromi naturali, nitriti e nitrati di sodio e di potassio in una dose massima di 195 p.p.m. (Figura 2).

Possono essere aggiunti anche vino, zuccheri, acido ascorbico e ascorbato di sodio. L'aggiunta di vino, zuccheri e aromi ha lo scopo di favorire lo sviluppo della flora microbica responsabile della stagionatura del prodotto e delle caratteristiche organolettiche tipiche del prodotto, tale flora microbica è rappresentata in particolare da batteri lattici, Micrococchi e Stafilococchi (Cantoni, 2010).

La composizione e il dosaggio degli ingredienti della miscela variano in funzione della ricetta del produttore, soprattutto per quanto riguarda le spezie impiegate, pertanto il profilo aromatico può risultare diverso.

Dall'unione tra il succo fuoriuscente dai pezzi di carne e la miscela si forma la salina. La salagione ha una durata di 10-15 giorni, a seconda della pezzatura, ed è interrotta da operazioni di rimestaggio, all'interno della vasca, dei pezzi di carne al fine di consentire l'uniforme migrazione del sale e degli aromi all'interno del muscolo. Durante questa fase il muscolo perde parte del suo contenuto di acqua.



*Figura 2. Tagli di carne cosparsi di miscela salina.*

Dopo la salagione la carne viene insaccata in un budello naturale o artificiale collagenico, inserita in una rete elastica e appesa nelle celle di asciugamento (Figura 3). La fase di asciugamento ha una durata media di una settimana e deve consentire una rapida disidratazione del prodotto; viene generalmente condotta a partire da una

temperatura di circa 25°C, che va poi a scalare di 1°C al giorno, e in condizioni di umidità relativa pari al 60-99%.

La fase finale è la stagionatura, effettuata in appositi locali climatizzati dove sia assicurato ricambio d'aria, il giusto grado di umidità (60-80%) e una temperatura media tra i 12 e 18°C.

La stagionatura, compreso il tempo di asciugamento, dura da 4 a 8 settimane in funzione della pezzatura.

Questo periodo permette un'ulteriore perdita dell'acqua contenuta e una concentrazione degli aromi che andranno poi a comporre il gusto e il profumo tipico del prodotto. Il calo peso a fine stagionatura è compreso tra il 30 e il 38%, a seconda della pezzatura e della durata della stagionatura.



*Figura 3. Bresaole insaccate appese nelle celle di asciugamento e stagionatura.*

Il prodotto stagionato viene poi sottoposto ad analisi chimiche e sensoriali al fine di garantire le specifiche caratteristiche organolettiche, chimiche, chimico-fisiche e merceologiche definite dal Disciplinare di Produzione (Figura 4).

Superati questi controlli la Bresaola della Valtellina può essere commercializzata intera, allo stato sfuso o sottovuoto, a pezzi, in tranci o affettata, confezionata sottovuoto o in atmosfera protettiva (Disciplinare di Produzione della Indicazione Geografica Protetta "Bresaola della Valtellina", 1998).



Figura 4. Bresaola stagionata pronta per la commercializzazione.

### 1.1.2 Microbiologia delle carni bovine fresche e stagionate

La Bresaola è un prodotto a base di carne bovina, crudo, stagionato e ottenuto dal muscolo intero.

La carne fresca costituisce un sistema alimentare molto complesso, con caratteristiche chimiche e chimico-fisiche tali da permettere e favorire lo sviluppo di molti microrganismi, alcuni dei quali utili o indifferenti, altri patogeni o alteranti.

La materia prima può essere caratterizzata da un punto di vista microbiologico dalla presenza di microrganismi alteranti Gram positivi quali *Brochothrix thermosphacta*, e Gram negativi quali *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*. Possono essere riscontrati anche altri Gram positivi non alternati come batteri lattici, Stafilococchi e Micrococchi (Hortensia Silla Santos, 1998; Cordero & Zumalacárregui, 2000; Zambonelli, 1992; Adams, 1998).

*B. thermosphacta* è un microrganismo in grado di causare alterazioni nei prodotti carnei quali cattivi odori causati dalla presenza di composti volatili prodotti durante il metabolismo microbico e sapori di acido e burro (Nowak & Piotrowska, 2012; Robinson & Batt, 2014; Cantoni *et al.*, 1992). Questo microrganismo, inoltre, se presente nella materia prima, è in grado di resistere alla fase di salagione grazie alle sue caratteristiche di alofilia, per poi essere successivamente inattivato durante la stagionatura con la progressiva diminuzione del valore di attività dell'acqua ( $a_w$ ).

Gli Enterobatteri così come le *Pseudomonas*, in particolare *Ps. fluorescens* e *Ps. fragi*, possono causare alterazioni nel prodotto dovute alla produzione di metaboliti, quali putrescine e cadaverina, derivanti dal catabolismo degli amminoacidi e che

determinano la formazione di odori e colorazioni anomali. Questi microrganismi sono inattivati durante la lavorazione dall'aggiunta del sale, dalle basse temperature e dal progressivo abbassamento dei valori di  $a_w$  (Zambonelli, 1992; Griglio *et al.*, 2011; Membré & Burlot, 1994; Borch *et al.*, 1996).

I batteri lattici (LAB) che, come detto sopra, sono presenti già nella materia prima sono rappresentati dai generi: *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (Nieminen *et al.*, 2011; Poirier & Coeuret, 2018). I LAB si distinguono in omo ed eterofermentanti, i primi producono quasi esclusivamente acido lattico dalla fermentazione degli zuccheri presenti favorendo lo sviluppo del sapore tipico dei prodotti carnei, mentre le specie eterofermentanti producono metaboliti non desiderabili come CO<sub>2</sub>, etanolo, acido acetico, acido butanoico, acetoina e perossido d'idrogeno e, per questo, talvolta si rendono responsabili di alterazioni cromatiche. Nel caso delle bresaole, le alterazioni provocate da LAB eterofermentanti sono riconducibili alla formazione di macchie bianche nel tessuto muscolare interno, i principali responsabili di questa problematica sono: *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc menteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *Carnobacterium maltoaromaticum*, *Carnobacterium gelidum* e *Weissella viridescens* (Kröckel, 2013; Shaw\* & Harding, 1989). La formazione delle macchie bianche, è dovuta all'azione ossidante del perossido di idrogeno sul pigmento muscolare nitrosomioglobina con inibizione dell'attività catalasica del pigmento muscolare.

Nel corso del processo produttivo della Bresaola va a selezionarsi un microbiota tipico, già presente nella materia prima e costituito dai seguenti generi microbici: *Lactobacillus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*. I primi, come già detto, sono presenti nella materia prima in quanto contaminanti ambientali e aumentano durante la stagionatura fino a concentrazioni pari a 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> ufc/g (Kröckel, 2013; Zambonelli, 1992; Paleari *et al.*, 2002; Hortensia Silla Santos, 1998). *Micrococcus* e *Staphylococcus* invece sono presenti soprattutto in salumi stagionati, non fermentati, non affumicati e non sottoposti ad un abbassamento spinto del pH come la Bresaola. Tra le specie che si riscontrano maggiormente: *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* (Lücke, 1994; Pietra *et al.*, 1998).

I Lattobacilli grazie alla loro attività metabolica producono acido lattico, che porta all'abbassamento del pH con conseguente inibizione della crescita di microrganismi alteranti e patogeni. Molti ceppi producono batteriocine come nisina e pediocina, attive

contro batteri patogeni, come *L. monocytogenes* e alteranti come *B. thermosphacta* (Abee *et al.*, 1995; Leroy *et al.*, 2005). Altri batteri lattici hanno, invece, la capacità di produrre perossido di idrogeno favorendo così l'inattivazione dei microrganismi alteranti, con azione battericida nei confronti dei Gram negativi (Kröckel, 2013).

Tra le specie di batteri lattici più frequentemente identificate in salumi crudi stagionati si trovano: *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. brevis* e membri del genere *Pediococcus* (Kröckel, 2013; Busconi *et al.*, 2014).

L'effetto principale della crescita di batteri dei generi *Micrococcus* e *Staphylococcus* nei salumi è lo sviluppo di caratteristiche organolettiche tipiche: colore, poiché svolgono un'azione riduttiva sui nitriti portando alla formazione di nitrosomioglobina, che dona il caratteristico colore ai salumi stagionati, ma anche su sapore e aroma, grazie alla loro attività lipolitica e proteolitica che porta alla produzione di particolari sostanze aromatiche (Rebecchi *et al.*, 1998). Infine i microrganismi appartenenti a questi generi ricoprono un ruolo anche nella prevenzione della rancidità dovuta all'ossidazione grazie all'azione perossidasi (Lücke, 1994).

Sulla materia prima possono essere presenti anche microrganismi patogeni, come *S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Yersinia* (Finazzi *et al.*, 2008; Tesson *et al.*, 2020). La fonte di questi agenti patogeni sono molto spesso gli stessi animali in quanto portatori asintomatici, che li possono ospitare sulla cute e nel tratto digerente ed è proprio da qui che i patogeni possono essere trasferiti sui tagli di carne durante le operazioni di macellazione, soprattutto nella fase di eviscerazione. Durante quest'operazione infatti il muscolo, fino a quel momento sterile, può essere contaminato dai microrganismi presenti nel tratto digerente (Zambonelli, 1992).

Nella carne di manzo *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* sono i tre patogeni di maggiore rilevanza (United States Department of Agriculture, 2005); i primi due si ritrovano spesso nella carne rossa fresca, in quanto microrganismi fecali che potrebbero contaminare la materia prima al momento della macellazione. *L. monocytogenes* invece è maggiormente associata a contaminazione durante le fasi di lavorazione della carne poiché ampiamente diffusa nell'ambiente (Nørrung & Buncic, 2008).

Generalmente il processo produttivo della bresaola, che prevede l'aggiunta di NaCl, di nitriti e nitrati e l'applicazione di temperature di refrigerazione nella prima parte per

favorire la penetrazione del sale, e successivamente un progressivo asciugamento che si traduce in una diminuzione dei valori di  $a_w$ , è in grado di garantire l'inattivazione dei patogeni potenzialmente presenti sulla superficie della materia prima (Cattaneo & Cantoni, 2005).

## 1.2 Il sequenziamento del DNA

Le prime metodologie di sequenziamento furono messe a punto a partire dalla fine degli anni Sessanta, la strategia fondamentale fu presentata nel 1977 da F. Sanger (Heather & Chain, 2016; Slatko *et al.*, 2018; Sanger *et al.*, 1977). Il sequenziamento enzimatico di Sanger prevedeva la copiatura del frammento da sequenziare tramite una DNA polimerasi e l'uso di analoghi chimici dei dNTP: i ddNTP, dideossi-nucleotidi terminatori di catena, cioè privi del gruppo 3'-OH dello zucchero necessario per formare il legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo (McCombie *et al.*, 2019; Chidgeavadze *et al.*, 1984). I ddNTP venivano marcati radioattivamente e mescolati ai dNTP determinando l'estensione e la generazione di frammenti di lunghezza diversa. Questi frammenti venivano fatti correre su un gel di poliacrilamide, con l'obiettivo di generare un pattern e di distinguere al suo interno i segmenti diversi in lunghezza (McCombie *et al.*, 2019). Con la lettura a raggi X dei frammenti, dal basso verso l'alto, poteva essere dedotta la sequenza nucleotidica.

Nel 1987 Applied Biosystem lanciò sul mercato il primo sequenziatore automatico, che sfruttava l'elettroforesi capillare e consentiva un sequenziamento più rapido e accurato (L. Liu *et al.*, 2012). La combinazione della strumentazione automatizzata di elettroforesi capillare e della tecnologia di sequenziamento Sanger, contribuì alla realizzazione del progetto genoma umano nel 2001 (Venter *et al.*, 2001). Questo progetto, nonostante il successo raggiunto, dimostrò alcuni dei limiti del metodo Sanger e la necessità di inventare nuove tecnologie che fossero in grado di processare un grande numero di genomi (Slatko *et al.*, 2018; Metzker, 2010). Ciò portò alla nascita di nuovi e potenti strumenti di sequenziamento, che determinarono una riduzione dei costi e della manodopera, così come un incremento nell'accuratezza e nella velocità. Queste nuove tecnologie, note con il nome di tecnologie *NGS*, *Next Generation Sequencing*, differivano dalle precedenti per il tipo di analisi realizzabili, in quanto massive e parallele (Metzker, 2010). Inoltre, diversamente dalle precedenti, univano

la fase dell'incorporazione nucleotidica con quella di acquisizione dei dati, portando alla generazione di una grande quantità di dati.

I flussi analitici di queste tecnologie si compongono di varie fasi tra cui la preparazione dei templati, il sequenziamento, l'imaging e l'analisi dei dati.

La preparazione dei templati consiste nell'amplificazione clonale degli stessi a partire da singole molecole di DNA. Essa si basa sulla rottura randomica del DNA genomico di partenza per generare frammenti di più piccola dimensione, che rappresentano il template di partenza (Metzker, 2010).

Per effettuare l'amplificazione clonale dei templati possono essere impiegate due strategie: la PCR in emulsione (*emulsion PCR*, *emPCR*) o l'amplificazione in fase solida (*solid-phase amplification*) (Fedurco *et al.*, 2006; Dressman *et al.*, 2003).

L'*emPCR* porterà alla generazione di biglie ricoperte da molecole di DNA e che verranno immobilizzate su un gel di poliacrilamide, oppure *crosslinkate* chimicamente a una superficie di vetro funzionalizzata con gruppi amminici, oppure posizionate nei pozzetti di una piastra *PTP*, *PicoTiterPlate*.

Similmente l'amplificazione in fase solida consente di avere cluster clonali del template di partenza. Tale processo si compone di due step: il primo è definito dall'adesione di una sequenza primer e dalla sua estensione a partire da molecole singole di template a singolo filamento; il secondo momento è invece definito dall'amplificazione vera e propria, definita *bridge amplification*, poiché i templati immobilizzati vengono amplificati a partire dai primer posti immediatamente accanto creando dei ripiegamenti a ponte e dei cluster di molecole (Heather & Chain, 2016; Voelkerding *et al.*, 2009).

Nel momento del sequenziamento si possono distinguere metodi dipendenti dalla DNA polimerasi (*Sequencing by synthesis*, *SBS*) e metodi dipendenti dalla DNA ligasi (*Sequencing by ligation*, *SBL*).

Nei primi il sequenziamento avviene attraverso l'uso di ddNTP, ognuno dei quali legato con un fluoroforo diverso; quando uno dei ddNTP viene incorporato nel filamento, l'emissione di fluorescenza viene rilevata da uno specifico detector, il software registra le diverse emissioni e le converte nella sequenza nucleotidica corrispondente. Il sequenziamento può avvenire partendo da una singola estremità (*single-end reads*), oppure da entrambe le estremità (*paired-end reads*). I secondi si basano, invece, sull'utilizzo di una ligasi e viene utilizzato un sistema di sonde: la sonda marcata con fluorescenza va a legare la sequenza complementare adiacente al template a cui è



stato legato il primer, in seguito la DNA ligasi unisce primer e sonda insieme. Le sonde libere vengono lavate via, la registrazione della fluorescenza segue subito dopo e può ripetersi il ciclo (Metzker, 2010; McCombie *et al.*, 2019).

Lo step di *imaging* prevede l'osservazione degli eventi, che possono essere raccolti tramite una misura della bioluminescenza o captati singolarmente per mezzo di un sistema a quattro colori.

Per quanto riguarda l'analisi dei dati, le tecnologie NGS non permettono un *assembly* de novo delle sequenze create, dette *reads*, ma piuttosto una ricostruzione indiretta per mezzo di allineamento su di un genoma di riferimento (McCombie *et al.*, 2019).

### 1.2.1 I sequenziatori NGS

Nel giro di un paio di anni, a partire dal 2005, sono state rilasciate la tecnologia 454 lanciata dalla 454 e poi acquistata dalla Roche, la tecnologia *Genome Analyzer* sviluppata dalla *Solexa*, che è stata poi acquistata da *Illumina*, la tecnologia *SOLiD*, *Sequencing by Oligo Ligation Detection*, messa in commercio da *Agencourt* e diverse tecnologie *Ion Torrent* messe in commercio da *Thermo-Fisher*.

Le prime tre piattaforme condividono molti passaggi: dalla preparazione della libreria all'amplificazione, fino alla biochimica fondante il sequenziamento vero e proprio (Zhou *et al.*, 2010), sfruttano inoltre un sistema di fluorescenza o luminescenza per la ricostruzione del filamento di DNA.

Nello specifico il Sistema 454-Roche prevede, durante la preparazione delle librerie, che alle estremità vengano legati specifici adattatori che contengono siti di riconoscimento di primer per l'amplificazione e il sequenziamento (Zhou *et al.*, 2010). Dopo la denaturazione delle molecole di DNA, le sequenze a singolo filamento vengono amplificate mediante PCR in emulsione (Figura 5) (Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012; Slatko *et al.*, 2018). Il sequenziamento viene effettuato attraverso la tecnologia del pirosequenziamento: quando un dNTP viene incorporato nella sequenza, porta al rilascio di un PPI, ossia il pirofosfato inorganico in quantità coerente con il numero di nucleotidi incorporati. Il PPI viene in seguito trasformato in ATP dall'ATP solforilasi in presenza di adenosina 5' fosfosolfato e contemporaneamente la luciferasi catalizza la reazione di trasformazione della luciferina in ossiluciferina. Questo porta alla

generazione di luce visibile proporzionale al numero di nucleotidi (Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012; Nyrén & Lundin, 1985; Margulies *et al.*, 2005).

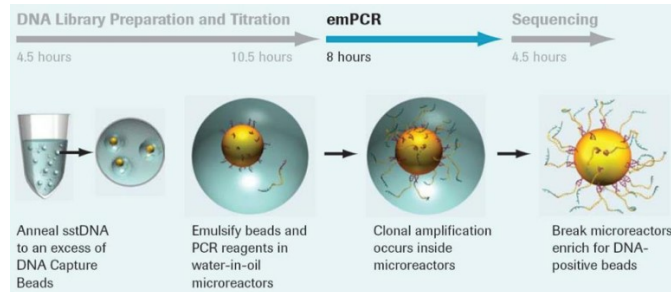


Figura 5. PCR in emulsione: rivestimento delle biglie tramite amplificazione clonale del DNA.

Nel Sistema Illumina, invece, la libreria viene costituita in modo che si abbiano delle sequenze di adattatori alle estremità, essa subisce poi denaturazione e viene fatta aderire alla cella di flusso per essere amplificata con metodo di amplificazione in fase solida (*bridge amplification*, Figura 6) che permette di ottenere dei cluster contenenti frammenti clonali di DNA (Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012; Reuter *et al.*, 2015). Per il sequenziamento viene adottata la tecnologia SBS, *sequencing by synthesis*: i frammenti subiscono linearizzazione e divengono a singolo filamento; successivamente i quattro differenti nucleotidi, marcati a fluorescenza, vengono aggiunti e incorporati un nucleotide per volta alla sequenza di riferimento grazie ad una DNA polimerasi (Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012). Il segnale viene emesso come 4 colori differenti a seconda del nucleotide incorporato (Reuter *et al.*, 2015; Metzker, 2010; Liu *et al.*, 2012).

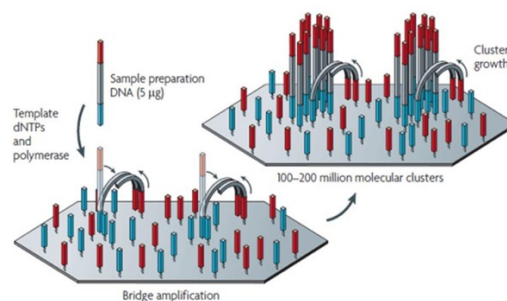


Figura 6. Bridge amplification: meccanismo di amplificazione in fase solida.

### 1.2.1.1 Ion Torrent

*Ion Torrent* viene conosciuta con il nome di tecnologia *post-light sequencing* poiché non impiega la fluorescenza e nemmeno la luminescenza (Rothberg *et al.*, 2011). Agisce in modo differente rispetto alle modalità precedenti poiché è l'unica tecnologia che impiega sistemi di chip semiconduttori, che vengono progettati sfruttando la tecnologia *CMOS*, *complementary metal-oxide-semiconductor*, che è una tecnologia utilizzata nella produzione di circuiti integrati moderni.

Al pari della tecnologia *454* sfrutta la PCR in emulsione che determina la formazione di cluster clonali di molecole di DNA attorno a biglie (Reuter *et al.*, 2015).

Il chip è l'elemento fondamentale della tecnologia: questo è ricoperto da milioni di pozzetti in cui avvengono le reazioni e contiene milioni di pixel capaci di convertire l'informazione chimica in sequenza. Dunque per dare inizio alla reazione, le librerie di DNA precedentemente preparate incorporando al template appositi adattatori, vengono legate a biglie tramite complementarità di sequenza tra biglie e adattatori stessi. Ha così inizio la PCR in emulsione, che porta ad avere milioni di biglie ricoperte da copie multiple di una stessa sequenza di DNA (Slatko *et al.*, 2018). Le biglie così ricoperte vengono riversate sul chip in modo che una sola biglia occupi un singolo pozzetto, mentre la "camera di sequenziamento" viene sommersa dai reagenti di sequenziamento, incluso uno dei quattro nucleotidi per volta, ogni 15 secondi; da qui ha inizio il sequenziamento, che si basa sul rilascio di un protone dovuto all'incorporazione di un nucleotide specifico da parte della DNA polimerasi (Liu *et al.*, 2012; McCombie *et al.*, 2019; Reuter *et al.*, 2015). Il sistema percepisce un cambiamento nel pH appena la base viene aggiunta nel chip, tuttavia esclusivamente quando il nucleotide immesso è quello corretto il sequenziatore è in grado di riconoscere la variazione di voltaggio; in caso contrario non si assiste a nessuna variazione, mentre in presenza di basi adiacenti che incorporano lo stesso nucleotide il sistema percepisce il cambiamento in modo proporzionale (Liu *et al.*, 2012).

È stato il primo strumento immesso in commercio a non richiedere sistemi di fluorescenza o di visualizzazione combinata, portando a risultati molto più rapidi, più economici e più contenuti in termini di dimensione di sequenziatore vero e proprio; non necessitando di sistemi come camere, fonti di luce o scanner, l'incorporazione nucleotidica viene direttamente convertita in voltaggio, che a sua volta viene direttamente registrato (Slatko *et al.*, 2018).

Ciò che permette di ottenere i dati di sequenziamento è la stessa struttura del chip, poiché questo contiene sensori *ISFET* (*ion-sensitive field-effect transistor*) che sono sensibili agli ioni (Rothberg *et al.*, 2011). In particolare questi ultimi, una volta rilasciati, determinano una modifica del pH del pozzetto che a sua volta indurrà una variazione di potenziale superficiale dello strato di ossido di metallo e, allo stesso modo, del transistor sottostante (Figura 7). La collaborazione tra i sensori posti sul fianco di ogni pozzetto e i meccanismi elettronici consente di avere una trasduzione diretta dall'evento di incorporazione al segnale elettrico in appena 4 secondi; mentre la dimensione micrometrica di ognuno dei pozzetti permette una diffusione rapida dei liquidi in entrambe le direzioni, eliminando la necessità di rimuovere enzimaticamente ogni reagente (Margulies *et al.*, 2005; Rothberg *et al.*, 2011).

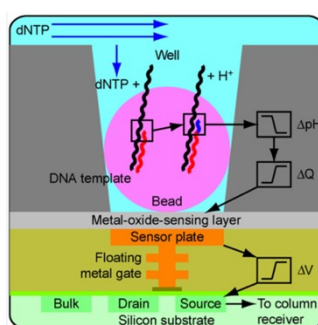


Figura 7. Metodo di sequenziamento con semiconduttori di Ion Torrent: variazione di pH e di potenziale indotte dal rilascio degli ioni  $H^+$  a seguito dell'incorporazione nucleotidica.

## 1.2.2 Le applicazioni dell'NGS

Tra le applicazioni su larga scala più idonee per questo tipo di tecnologia si possono ritrovare la genomica, la metagenomica, l'epigenomica e la trascrittomica (Zhou *et al.*, 2010). Ciò permette di fare ricerca di base e inoltre di approfondire aspetti pratici utili alla ricerca stessa, fra cui la diagnostica, la prognostica e la terapia farmacologica (L. Liu *et al.*, 2012). Le applicazioni del sequenziamento possono riguardare il sequenziamento del DNA *de novo* o il ri-sequenziamento, dell'intero genoma o di regioni target opportunamente scelte, oppure il sequenziamento del trascrittoma comprendente tutte le molecole di RNA.

Con lo sviluppo di tali tecnologie e il ri-sequenziamento del genoma umano, si è arrivati a conoscere le varianti a singolo nucleotide e in generale le varianti strutturali del

genoma. Lo studio dell'intero trascrittoma ha permesso, invece, di comprendere i diversi ruoli cellulari svolti dalle molecole di RNA, così come la loro struttura, le interazioni con le proteine e la localizzazione genomica (Reuter *et al.*, 2015).

La metagenomica riguarda l'analisi dell'intero genoma di microrganismi a partire dall'estrazione diretta del DNA da campioni di comunità microbiche non coltivate (Cao *et al.*, 2017). Gli studi di metagenomica hanno permesso di raccogliere informazioni su un numero molto vasto di campioni, provenienti dalle più svariate fonti, compreso l'uomo e l'ambiente (Reuter *et al.*, 2015). Tra le svariate fonti è anche possibile riscontrare matrici alimentari di varia natura, nelle quali il microbioma colonizzante è costituito da popolazioni microbiche molto varie e responsabili di fenomeni come fermentazione, contaminazione e deterioramento (Cao *et al.*, 2017). L'applicazione delle tecnologie massive e parallele ha consentito una valutazione profonda di queste matrici, riportando informazioni in merito ai profili microbici, alla variabilità di popolazioni e alle interazioni tra queste.

Accanto alla metagenomica si è da sempre identificato come elemento fondamentale l'rRNA 16S, che ha permesso di ottenere informazioni filogenetiche (Reuter *et al.*, 2015). Inoltre, questo strumento diviene fondamentale nella valutazione di tutti gli aspetti che possono contribuire in modo differente alla composizione microbica delle fonti ambientali, fra cui quelle alimentari: le condizioni igienico-sanitarie, la qualità della materia prima, l'ambiente di lavorazione e di conservazione (Cao *et al.*, 2017).

### **1.3 Il gene 16s rDNA**

L'identificazione batterica di carattere fenotipico è stata utilizzata da sempre in ogni laboratorio microbiologico in qualità di metodo elettivo per le analisi di routine. Tale metodo tradizionale, tuttavia, richiede tempo e un'interpretazione dei dati spesso molto arbitraria; inoltre, la variabilità intra-specifica caratteristica dei diversi ceppi non consente una chiara identificazione (Drancourt *et al.*, 2000; Stager & Davis, 1992). Da sottolineare è anche la difficoltà che si incontra nel caso di batteri non coltivabili poiché sconosciuti o di difficile mantenimento all'interno di laboratori.

Accanto a questo metodo, spicca l'identificazione molecolare basata sul DNA ribosomiale 16S, detto anche rDNA o rRNA se si parla di RNA ribosomiale.

Tale gene è diventato lo standard per la determinazione delle relazioni filogenetiche, per riconoscere la diversità nell'ambiente, per l'identificazione e la quantificazione di popolazioni specifiche (Acinas *et al.*, 2004; Head *et al.*, 1998; Hugenholtz *et al.*, 1998). Rappresenta uno dei metodi coltura-indipendenti più importanti, in particolare è riconosciuto come marcatore genetico costitutivo dal momento che è universalmente distribuito tra i batteri (Janda & Abbott, 2007). È la diversità di sequenza all'interno del gene stesso a conferire la possibilità di distinguere le diverse specie batteriche, poiché qui sono riscontrabili regioni variabili specie-specifiche distinguibili per lunghezza, conservazione e grado di informazione (Chakravorty *et al.*, 2007; Watts *et al.*, 2017). Le regioni definite ipervariabili identificate sono 9 in totale e classificate dalla V1 alla V9, consentendo una discriminazione dei taxa batterici all'interno di differenti ambiente microbici (Wang & Qian, 2009; Baker *et al.*, 2003).

All'interno del gene ci sono circa 1500 pb, accanto alle regioni ipervariabili V1-V9 si ritrovano regioni altamente conservate che possono essere sfruttate per il legame da parte dei primer e che permettono l'identificazione dei differenti taxa batterici (Abellan-Schneyder *et al.*, 2021) (Figura 8).

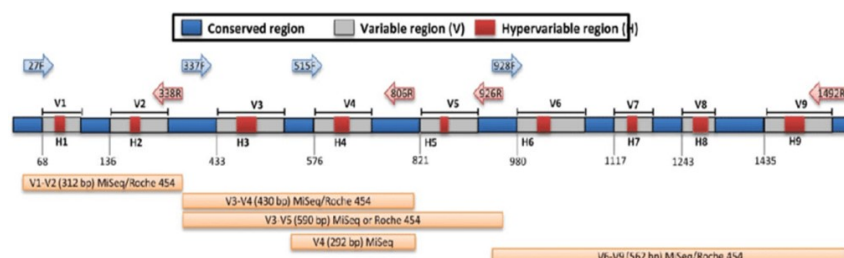


Figura 8. Organizzazione strutturale del gene 16S rDNA.

Siccome la funzione del gene 16S rDNA non è variata granchè nel tempo, esso può essere riconosciuto come marcatore genetico e dunque i cambiamenti randomici nella sequenza sono identificativi dell'evoluzione; la sua lunghezza di circa 1500 pb lo rende, inoltre, idoneo per analisi informatiche (Patel, 2001). Ciò porta all'identificazione anche degli isolati più rari e inusuali, dei ceppi intraspecie e dei microrganismi identici dal punto di vista fenotipico (Drancourt *et al.*, 2000; Janda & Abbott, 2007).

In particolare, diversi studi evidenziano come le regioni *ITS* (*internal transcribed spacer*) del gene 16S rDNA, possono essere impiegate in qualità di tool genetico per

la discriminazione di specie filogeneticamente molto vicine, fra cui i ceppi intraspecie (Mora *et al.*, 2003; Conrads *et al.*, 2002).

Come suggeriscono alcuni autori, il sequenziamento del gene 16S rDNA può rappresentare uno strumento utile nell'identificazione microbica a condizione che la sequenze nucleotidiche rilasciate nei database di riferimento siano affidabili e che la qualità di queste ultime sia idonea; in caso contrario, non essendo un metodo infallibile, potrebbero presentarsi dei problemi nella classificazione filogenetica a livello di specie per alcuni generi. Vanno poi considerate tutte le fonti di variabilità introdotte con il processo di identificazione batterica, da quelle biologiche a quelle più tecniche e pratiche: le differenze riscontrabili fra le regioni conservate, l'efficienza di annealing dei primer, la scelta della specifica regione V e la sua caratteristica sensibilità potrebbero generare delle differenze nel processo di classificazione (Abellan-Schneyder *et al.*, 2021).

I sequenziatori di nuova generazione sfruttano tutte queste caratteristiche del gene 16S per le identificazioni metagenomiche; tramite PCR si amplifica uno o più regioni del gene stesso, si prepara la libreria, segue il sequenziamento vero e proprio e infine l'analisi dei dati di sequenziamento ottenuti. Sfruttando le tecnologie di nuova generazione e scegliendo la specifica regione conservata da targhetare con uno o più set di primer, è possibile ricoprire da una a tre regioni adiacenti all'interno del gene 16S. I dati ottenuti verranno processati: le sequenze saranno raccolte in *OTU*, *operational taxonomic units*, e impiegate per l'assegnazione tassonomica sfruttando diversi database di sequenze del gene 16S rDNA come *GreenGenes* (GG), *Ribosomal Database Project* (RDP), *Silva*, *Genomic-Based 16S rRNA Database* (GRD) oppure *The All-Species Living Tree* (LTP) (Abellan-Schneyder *et al.*, 2021).

La tecnologia *Ion Torrent* ha rilasciato dei kit metagenomici che impiegano in modo differente le regioni V2, V3, V4, V6-7, V8 e V9, da cui vengono raccolte e combinate insieme diverse informazioni (Watts *et al.*, 2017).

### 1.3.1 Esempi di 16S amplicon sequencing in prodotti carnei

L'amplicon sequencing in ambito alimentare, e nello specifico per quanto riguarda i prodotti carnei, viene utilizzato per raggiungere svariati obiettivi: alcuni autori (Van Reckem *et al.*, 2021) hanno sfruttato questa tecnologia per indagare l'effetto di diverse temperature di fermentazione e profili di acidificazione sulle comunità microbiche caratterizzanti durante la fermentazione spontanea di prodotti carnei, in questo modo è possibile comprendere come il microbiota venga influenzato dal processo produttivo. In un altro studio, gli autori (Van Reckem *et al.*, 2020) hanno analizzato carni fermentate provenienti da diverse origini e hanno utilizzato il sequenziamento per valutare un possibile legame tra il prodotto carneo, la tecnologia di lavorazione e l'origine geografica; la conoscenza della diversità delle specie microbiche delle carni fermentate ha quindi permesso loro di controllare lo sviluppo della qualità. X. Liu *et al.*, 2021, nel loro studio si sono proposti di verificare se la tecnologia NGS potesse essere utilizzata come metodo per la certificazione di prodotti a base di carne misti, in particolare in questo studio sono stati utilizzati mix con diverse proporzioni di cinque tipi di carne comune (suina, bovina, ovina, di pollo e anatra), i risultati ottenuti hanno mostrato che tutti e cinque i tipi di carne potevano essere identificati correttamente e che la composizione della carne poteva essere rilevata fino allo 0,5% nei campioni misti. Nel 2015 Polka *et al.* hanno invece studiato la diversità batterica in lotti di Salame Piacentino DOP, per poter conoscere quali popolazioni microbiche fossero coinvolte nelle caratteristiche organolettiche finali di questo prodotto tradizionale e i risultati hanno confermato la presenza dei principali generi batterici coinvolti nella fermentazione del salame (*Staphylococcus* e *Lactobacillus*). Infine Kang *et al.* nel 2020 hanno utilizzato il sequenziamento per studiare la microbiologia che caratterizza le sale di macellazione, in particolare la sala di disosso, poiché molto spesso origine di contaminazione per la materia prima, al fine di migliorare la comprensione di tali fonti; grazie alla porfilazione delle sequenze geniche 16S questi autori hanno, infatti, dimostrato che la contaminazione dei prodotti disossati può essere il risultato di una contaminazione dalle superfici ambientali che sono regolarmente a contatto con la rifilatura di carne.



## **2 SCOPO DELLA TESI**

La Bresaola della Valtellina è un prodotto della tradizione culinaria del Nord Italia e si caratterizza per le proprietà organolettiche specifiche, ma che possono presentare differenti sfumature a seconda dell'ambiente di produzione. Questo perché, nonostante le modalità di produzione siano le stesse per tutti i produttori, gli ambienti di lavorazione possono esercitare una selezione sul microbiota tipico. Quest'ultimo può inoltre variare a seconda delle caratteristiche delle materie prime, delle condizioni ambientali, ecologiche, di lavorazione e di stagionatura.

Il presente lavoro, svolto presso il laboratorio di Microbiologia della Stazione Sperimentale per l'Industria della Conserve Alimentari (SSICA) di Parma, si propone di studiare il microbiota superficiale di 48 campioni, derivanti da 12 bresaole, provenienti da 3 diversi stabilimenti, scelti sulla base della zona e dell'ampiezza della produzione. Le bresaole impiegate nel lavoro in oggetto, suddivise per stabilimento di provenienza e fase di produzione, sono rappresentative di tutto il processo produttivo. Dal momento che è stato riconosciuto l'importante ruolo delle specie batteriche nella maturazione del prodotto in quanto contribuiscono alla qualità o, in condizioni sfavorevoli, causano problemi di alterazione, un'identificazione accurata del microbiota potrebbe rivelare i meccanismi che influenzano lo sviluppo delle sue caratteristiche e l'impatto sulla qualità del prodotto.

Per superare tutte le limitazioni insite nelle tecniche tradizionali, quali i tempi richiesti, il numero di prove e i metodi di identificazione basati su caratteristiche fenotipiche e biochimiche, si è deciso di impiegare la tecnologia di sequenziamento *NGS* per mezzo della piattaforma *Ion S5* di *Ion Torrent*. Un sistema massivo e parallelo che consente l'identificazione simultanea di tutte le specie microbiche presenti in un campione, sulla base del sequenziamento di specifiche porzioni di DNA, quali le regioni contenute all'interno del gene 16S.

### **3 MATERIALI E METODI**

Il seguente progetto di tesi si è focalizzato sulla caratterizzazione delle comunità microbiche residenti a livello superficiale di Bresaola. Tale analisi ha preso in considerazione un insieme di campioni differenti per stabilimento di appartenenza, che andassero a ricoprire tutte le varie fasi del processo produttivo di questo prodotto carneo: la materia prima, la salagione, l'asciugamento e la stagionatura.

Il lavoro si è basato in primo luogo su una valutazione molecolare, tramite tecnologia di *Next Generation Sequencing (NGS)*, e successivamente su una rielaborazione dei dati ottenuti, in modo da ottenere un'analisi tassonomica dei microrganismi presenti in più possibile accurata e trarre le dovute conclusioni in merito.

La tecnologia che è stata impiegata è la versione *Ion S5™ System (ThermoFisher Scientific™)* per il sequenziamento, mentre per l'amplificazione clonale delle librerie e per il caricamento dei chip è stato utilizzato il sistema automatizzato *Ion Chef™ (ThermoFisher Scientific™)*.

### **3.1 Selezione delle Bresaole**

Nell'ambito di un progetto relativo alla validazione del processo produttivo della bresaola, sono stati selezionati campioni da sottoporre a caratterizzazione metagenomica con NGS; in particolare sono state valutate le produzioni di tre diverse aziende selezionate in base alla diversa ampiezza della produzione e al diverso luogo di ubicazione. Per ognuna di esse a ciascuna fase del processo produttivo sono stati effettuati campionamenti su quattro bresaole, in particolare:

- 4 campioni dalla materia prima;
- 4 campioni a fine sale;
- 4 campioni a fine asciugamento;
- 4 campioni a fine stagionatura;

per un totale di 48 campioni da sottoporre ad analisi NGS.

L'obiettivo è stato valutare l'andamento del microbiota durante il processo produttivo e la presenza di eventuali differenze tra le tre aziende prese in esame.

Le bresaole sono state scelte sulla base di alcune caratteristiche distintive:

#### 1. Area di produzione della bresaola

Sono state selezionate aziende ubicate in zone differenti: l'azienda A è ubicata in provincia di Milano; mentre le aziende B e C in provincia di Sondrio.

#### 2. Modalità di produzione della bresaola

Sono state scelte le aziende sulla base delle modalità di produzione, esse si distinguono infatti poiché più o meno industriali, oppure più o meno artigianali; ma anche sulla base dell'ampiezza della produzione, che può essere più o meno estesa.

Per semplificare la classificazione dei dati, i campioni sono stati indicati con un codice così definito:

- Una lettera, indicante l'azienda presa in esame: A, B o C.
- Una sigla di lettere, indicanti la fase di processo analizzata: MP (materia prima); FS (fine sale); FA (fine asciugamento); FST (fine stagionatura);
- Un numero, in ordine crescente, indicante la specifica bresaola presa in esame.

### **3.2 Preparazione dei campioni di partenza**

I campionamenti e le successive determinazioni sono stati effettuati presso il laboratorio di Microbiologia della Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari di Parma. Per ogni bresaola sono stati prelevati circa 25 g di prodotto superficiale e che sono stati trasferiti in un sacchetto sterile da diluizione per Stomacher, dotato di filtro, e diluiti in SOLP (soluzione fisiologica peptonata, 0,85% NaCl e 0,1% peptone) in proporzione 1:10.

Il campione è stato sottoposto a omogenizzazione tramite strumento Stomacher (AES) per un totale di 2 minuti.

Successivamente sono stati prelevati 5 mL di sospensione, trasferiti in provetta e sottoposti a centrifugazione a 13000 rpm per 30 minuti.

Al termine di questa fase è stato scartato il surnatante e il pellet ottenuto è stato conservato a -20°C, in attesa della fase seguente, cioè l'estrazione e la purificazione del DNA.

### 3.3 Estrazione del DNA

L'estrazione e la purificazione del DNA sono state condotte mediante il kit "*MagMax™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation Kit, with bead tubes*" (*ThermoFisher Scientific*), seguendo la procedura alla sezione "*Perform total nucleic acid purification from soil, biofluid and other samples using Bead tubes*" contenuta all'interno del protocollo di estrazione manuale fornito dal produttore.

I passaggi previsti da questo protocollo sono i seguenti: lisi del campione, digestione con Proteinasi K, legame alle biglie magnetiche, lavaggio delle biglie ed eluizione dell'acido nucleico estratto.

Il pellet di partenza viene trattato come se fosse una coltura batterica: è stato addizionato e sospeso in 800  $\mu\text{L}$  di *Lysis Buffer* e trasferito all'interno di *Bead tubes*, provette contenenti biglie di zirconio. Il metodo sfrutta uno step di "bead beating" per agevolare il processo di lisi meccanica di tutte le cellule presenti, consentendo il rilascio di acido nucleico. Questa operazione è resa possibile dall'azione del *Disruptor genie™* (*Scientific Industries*) sulle cellule a contatto con le biglie a 2500 rpm per 10 minuti.

Segue uno step di centrifugazione a 14000 x g per 2 minuti per separare il surnatante contenente l'acido nucleico dal pellet costituito dalle biglie.

500  $\mu\text{L}$  del surnatante vengono poi trasferiti in una eppendorf da 1,5 mL, a cui si aggiungono 40  $\mu\text{L}$  di Proteinasi K per la digestione delle nucleasi che andrebbero a degradare l'acido nucleico di interesse. La sua attività viene agevolata da un'agitazione meccanica a 900 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, operata con il termomiscelatore *ThermoMixer C* (*Eppendorf*) e dal successivo trasferimento in *Multi-Blok® Block Heater* (*Lab-Line*) a 65°C per 20 minuti.

Contemporaneamente vengono poste a temperatura ambiente le biglie *Binding Bead Mix* al fine di far loro raggiungere la temperatura adeguata per la fase successiva, in cui un volume di 520  $\mu\text{L}$  viene aggiunto in ogni campione, che viene poi posto in agitazione a 900 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente.

Trascorso il tempo necessario, le eppendorf vengono trasferite su un supporto magnetico (*DynaMag™-2 Magnet*, *Invitrogen*) per favorire l'attrazione delle biglie magnetiche su cui è adeso il DNA genomico. Il sistema sfrutta le biglie magnetiche perché in grado di legare il DNA in modo più efficiente e con una resa migliore rispetto

a metodi alternativi, come i filtri in fibra di vetro. Nello specifico la tipologia di biglia contenuta nel kit è ottimizzata per la cattura dell'acido nucleico, esse sono costituite da polistirene altamente cross-linkato e materiale magnetico uniformemente distribuito.

Quando tutte le biglie hanno aderito al magnete si può procedere con lo step successivo, cioè l'eliminazione del surnatante e varie fasi di lavaggio. Queste ultime sono effettuate mediante l'aggiunta di 1 mL di *Wash Buffer* e l'agitazione delle eppendorf a 800 rpm per 30 secondi. Esse vengono poi poste nuovamente sul supporto magnetico al fine di poter eliminare il surnatante. Il lavaggio viene ripetuto per 3 volte: la prima con *Wash Buffer* e le ultime due con etanolo al 70%. Eventuali residui di etanolo devono essere rimossi dalle biglie facendole asciugare mediante agitazione delle eppendorf aperte a 800 rpm per 2 minuti.

L'ultima fase è quella dell'eluizione dell'acido nucleico mediante l'aggiunta di 50  $\mu$ L di *Elution Solution*. I campioni sono posti nel *Multi-Blok® Block Heater (Lab-Line)* a 75°C per 5 minuti, poi messi in agitazione a 800 rpm per 5 minuti e infine posti sul supporto magnetico.

L'eluato ottenuto, che contiene l'acido nucleico, viene trasferito in una eppendorf.

Prima di procedere con lo step successivo, il DNA che è stato estratto deve essere quantificato in termini di concentrazione in ng/ $\mu$ L, così da avere un'idea indicativa della quantità di DNA presente nell'eluato. Per determinare tale concentrazione viene utilizzato lo spettrofotometro *Nanophotometer P330 (IMPLEN)* e come *BLANK* viene impiegato 1  $\mu$ L di soluzione di eluizione fornita dal kit.

Ognuno dei campioni viene catalogato riportando anche la specifica concentrazione in ng/ $\mu$ L e nel caso di campioni troppo concentrati viene determinata una diluizione degli stessi per favorire lo step successivo.

I campioni vengono infine conservati a -20°C fino al loro successivo utilizzo.

### **3.4 Preparazione degli ampliconi**

Il passaggio successivo consiste nella preparazione degli ampliconi e questo si compone di 3 ulteriori step: in primo luogo deve essere fatta un'amplificazione delle regioni ipervariabili del 16S utilizzando il kit "*Ion 16S™ Metagenomics Kit*" (*Thermo Scientific™*); questa fase prevede due PCR multiplex separate, ciascuna con uno

specifico set di primer. La prima reazione coinvolge il set di primer V2-4-8, mentre l'altra impiega il set di primer V3-6, 7-9; si otterranno quindi amplificati delle regioni ipervariabili V2, V3, V4, V6, V7, V8 e V9. In ciascuna reazione sono inclusi un controllo positivo (DNA di *Escherichia coli*) e uno negativo (*Nuclease-free Water*).

Il programma per il ciclo termico impostato nel termociclatore *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)* è riportato in Tabella 1.

<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
<b>Sosta</b>	95°C	10 minuti
<b>25 cicli</b>	95°C	30 secondi
	58°C	30 secondi
	72°C	20 secondi
<b>Sosta</b>	72°C	7 minuti

Tabella 1. Programma di amplificazione delle regioni ipervariabili del gene 16S

Completato il programma di amplificazione, i campioni devono essere sottoposti a un processo di purificazione. Seguendo il protocollo, la purificazione viene effettuata impiegando delle biglie magnetiche (*CleanNGS - CleanNA*) e una doppia procedura di lavaggio con etanolo al 70%. Anche in questa fase l'etanolo in eccesso dovrà essere asciugato in modo opportuno. Sfruttando nuovamente il supporto magnetico, le biglie verranno trattenute per mezzo dell'interazione magnetica; infine, l'eluizione con 15 µL di *Nuclease-free Water* consente di recuperare i prodotti di amplificazione purificati dai reagenti di amplificazione.

L'ultima fase di questo passaggio prevede il calcolo della quantità di DNA di input da impiegare per lo step successivo, che consiste nella preparazione della libreria. La misura della concentrazione viene effettuata impiegando lo strumento *Qubit™ 3 Fluorometer (Invitrogen™)*, seguendo il protocollo fornito dal produttore e utilizzando il kit "*Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kit (Invitrogen™)*". Seguendo le indicazioni fornite viene preparata la *Qubit® Working Solution* miscelando insieme i due reagenti (*Qubit® reagent* e *Qubit® buffer*).



Una volta ottenute le concentrazioni degli ampliconi, con la formula sotto riportata, vengono stabiliti i volumi da prelevare e da combinare insieme per avere un volume finale relativo a entrambi gli ampliconi.

$$C_f = \frac{C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2}{V_1 + V_2}$$

Viene così trovata la concentrazione finale del volume totale e da qui potrà essere valutata la quantità di DNA da impiegare nello step successivo.

Gli ampliconi verranno conservati a -20°C fino al loro successivo utilizzo.

### 3.5 Preparazione della libreria

Questo step viene realizzato interamente utilizzando il kit “*Ion Plus Fragment Library Kit*” (*Ion Torrent™*) e seguendo il protocollo previsto, composto da tre passaggi fondamentali: “*End repair and purify pooled amplicons*”, “*Ligate and nick-repair*” e infine “*Purify the adapter-ligated and nick-repaired DNA*”. La quantità di DNA da impiegare come input deve essere compresa tra 10-100 ng. Dopo aver determinato il volume necessario, gli ampliconi sono stati portati a volume finale con acqua, sono stati aggiunti i reagenti previsti dalla reazione e il tutto è stato incubato per 20 minuti a temperatura ambiente.

Il primo passaggio consiste nell’impiegare un enzima in grado di riparare le estremità dei pool degli ampliconi. A questa prima fase segue la procedura di purificazione degli ampliconi con le biglie magnetiche e infine un passaggio di eluizione con 16 µL di *Low TE*.

Il passaggio successivo, definito come “*Ligate and nick-repair*”, utilizza il medesimo kit e inoltre, a seconda della quantità di campioni impiegati, vengono addizionati i Barcode contenuti nei seguenti kit di *Ion Torrent™*: *Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit*; *Ion Xpress™ Barcode Adapters 17-32 Kit*; *Ion Xpress™ Barcode Adapters 33-48 Kit*.

Il passaggio consiste nell’utilizzo di Barcode, cioè corte sequenze nucleotidiche numerate e riconosciute dal sistema *Ion Torrent*, impiegate per identificare in modo univoco il campione desiderato. Seguendo le indicazioni fornite, insieme al Barcode X specifico per ogni campione vengono aggiunti i vari reagenti, incluse le sequenze di

adattatori necessarie per legare la libreria creata alle biglie (*Ion Sphere Particle*) e consentire di conseguenza la successiva amplificazione clonale della stessa, tramite la PCR in emulsione prevista dalla tecnologia. L'adesione di tali sequenze, barcode e adattatori, restituisce la generazione di librerie (Figura 9).

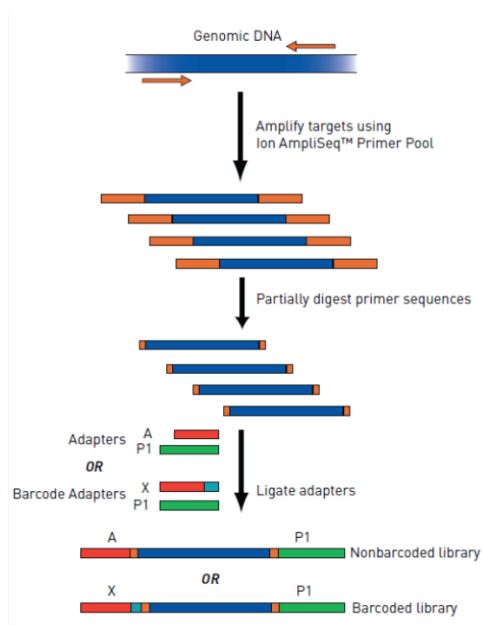


Figura 9. Preparazione della libreria: ligazione degli adattatori e dei barcode agli ampliconi.

Campioni diversi che verranno rappresentati all'interno dello stesso pool di librerie dovranno presentare barcode differenti, in caso contrario il sequenziamento non riuscirebbe a distinguere fra le diverse librerie.

La reazione di una ligasi, insieme all'aggiunta di dNTP previsti tra i reagenti, consente di ottenere tale risultato.

Mentre la fase di *Nick repair* viene effettuata dalla *Nick Repair Polymerase* fornita nel kit, che consente di riparare le rotture a singolo filamento.

Per determinare le azioni di riparo e di legame delle librerie, viene operato il seguente protocollo termico (Tabella 2):

Fase	Temperatura	Tempo
Sosta	25°C	15 minuti
Sosta	72°C	5 minuti

Tabella 2. Programma termico per il legame e il riparo a singolo nucleotide.

Lo strumento viene portato a 25°C e in seguito viene fatto partire il protocollo termico; terminato il programma, segue un doppio step di purificazione con le biglie magnetiche.

Questo dovrebbe favorire l'eliminazione delle sferette che non presentano sulla loro superficie cluster di molecole della stessa tipologia.

Il passaggio finale consiste nella eluzione della libreria con 20 µL di *Low TE*.

### 3.6 Determinazione della concentrazione della libreria

Lo step successivo diviene fondamentale per massimizzare il numero di reads utili alla fase di sequenziamento. Prima di procedere con l'amplificazione clonale e il caricamento dei chip, è necessario determinare la concentrazione ottimale di libreria per definire dei risultati idonei. Una diluizione eccessiva comporta l'ottenimento di poche reads, mentre una diluizione scarsa può portare a una prevalenza di biglie policlonali facendo perdere reads utili al sequenziamento.

Prima di determinare la concentrazione, viene allestita un'ulteriore amplificazione della libreria precedentemente ottenuta. Viene utilizzato il kit "*Ion Plus Fragment Library Kit*" miscelando i reagenti alla libreria e seguendo le istruzioni fornite viene svolto il seguente protocollo termico (Tabella 3):

Fase	Step	Temperatura	Tempo
Sosta	Denaturazione	95°C	5 minuti
5 cicli	Denaturazione	95°C	15 secondi
	Annealing	58°C	15 secondi
	Estensione	70°C	1 minuto
Sosta	-	4°C	1 ora

Tabella 3. Programma di amplificazione della libreria.

Terminato il protocollo termico, la libreria viene purificata due volte utilizzando le biglie magnetiche; infine i campioni vengono eluiti con 20 µL di *Low TE*.

Solo successivamente alla purificazione viene realizzata la fase di determinazione della concentrazione della libreria amplificata e purificata ottenuta.

Il valore della concentrazione viene ottenuto tramite uno step di qPCR, utilizzando il kit “*Ion Universal Library Quantification Kit*” (*Thermo Scientific™*). La real-time PCR viene realizzata con lo strumento *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (*Bio-Rad*). Nella realizzazione viene incluso come standard la libreria di controllo di *E. coli* DH10B *Ion Control Library*, con la concentrazione di partenza pari a 6,8 pM e le opportune diluizioni previste. Il sistema prevede di impiegare come fluoroforo di riferimento passivo il *Rox™ Reference Dye* e come *TaqMan® probe reporter/quencer* il fluoroforo *FAM™ dye*.

Il programma che viene svolto con lo strumento è riportato in Tabella 4:

Fase	Temperatura	Tempo
Sosta	95°C	20 secondi
40 cicli	95°C	3 secondi
	60°C	30 secondi

Tabella 4. Programma termico di real-time PCR.

Terminato il programma i risultati vengono esportati e rielaborati. Le concentrazioni ottenute vengono impiegate per ricavare i rispettivi valori di diluizione da applicare ai campioni, considerando una concentrazione finale di 25 pM. La quantità di DNA da prelevare per la preparazione della libreria varia a seconda del campione, questa dovrà poi essere opportunamente diluita considerando il rispettivo valore di diluizione trovato in precedenza. Il volume totale che si andrà ad ottenere comprenderà il volume di acqua aggiunto (y) e il volume di DNA, per cui conoscendo il fattore di diluizione calcolato si potrà determinare il volume di acqua da aggiungere nel seguente modo, considerando ad esempio un volume di DNA pari a 2 µL:

$$y = (x \times 2) - 2$$

Trovati i singoli volumi di acqua da aggiungere, si procede con la diluizione delle librerie.

Infine, vengono uniti insieme i campioni, prelevando X µL, in modo da creare un pool equilibrato e bilanciato delle librerie presenti al suo interno. Il pool di librerie

rappresenterà il punto di partenza da cui prelevare il volume necessario per procedere con il passaggio successivo. Dal momento che lo strumento *Ion Chef™* consente di caricare due chip, per ottimizzare i reagenti utilizzati vengono preparati due pool di librerie.

### 3.7 Amplificazione clonale e caricamento dei chip

Questi passaggi sono interamente realizzati dallo strumento *Ion Chef™* (*ThermoFisher Scientific*) in modo automatico overnight. I kit che vengono utilizzati sono il kit “*Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef™* (*Ion Torrent™*) per i reagenti e il kit “*Ion 510™ Chip Kit™* (*Ion Torrent™*) per il chip.

Per poter svolgere, in primo luogo, l'amplificazione clonale e, successivamente, il caricamento dei chip con le biglie ricoperte da molecole di DNA è necessario programmare la corsa utilizzando il *Torrent Server* tramite il *Torrent Browser*, facendo il login al *Torrent Suite™ Software*.

Seguendo la guida all'utente “*Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef™*” viene pianificata la corsa e vengono selezionati: il tipo di strumento, il tipo di chip, il tipo di kit impiegato per la preparazione della libreria, il tipo di set di barcode utilizzato, lo strumento *Ion Chef™* e il kit “*Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef™*” per la preparazione delle librerie amplificate clonalmente, il kit per il sequenziamento e infine il numero di flussi.

Successivamente viene stabilito il nome della corsa, viene inserito il numero di barcode utilizzati nel caso specifico, infine si procede con la scannerizzazione dell'etichetta del tubo del pool relativo alla prima libreria e del barcode del chip indicato come chip 1.

Inoltre vengono indicati il nome del campione (*Sample Name*), il codice identificativo del campione (*Sample ID*) e la descrizione del campione (*Sample Description*) associati al barcode prescelto per il campione in questione. Il tutto viene effettuato per ogni campione e al termine la schermata presenterà tutte le informazioni e la corsa potrà essere lanciata (Figura 10).

Copy Plan bresboe usa    Ion Reporter    Research Application    Kits    Plugins    Projects    **Save**

[Show Summary](#)

Run Plan Name (required):

Analysis Parameters:  Default (Recommended)    Custom   [Details +](#)

Default Reference & BED Files

Reference Library:

Target Regions:

Hotspot Regions:

Use same reference & BED files for all barcodes

Number of barcodes:

Sample Tube Label:

Chip Barcode:

Enter a sample name for each barcode used (require at least one sample)    :

Oncology       Pre-implantation Genetic Screening

#	Barcode	Sample Name (required)	Control Type	Sample ID	Sample Description	Reference	Sample Collection Date	Sample Receipt Date	Ion Reporter Workflow	Show All Workflows	Relation	Gender	Population	Mouse Strains	IR Set ID
1	IonXpress_001 (CTAAGGTAAC)	BMP 1		BMP 1 materia prima	BMP 1 A L				Upload Only	<input type="checkbox"/>	Self	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	1
2	IonXpress_002 (TAAGGAGAAC)	BMP 2		BMP 2 materia prima	BMP 2 A L				Upload Only	<input type="checkbox"/>	Self	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	2
3	IonXpress_003 (AAGAGATTG)	BMP 3		BMP 3 materia prima	BMP 3 A L				Upload Only	<input type="checkbox"/>	Self	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	3
4	IonXpress_004 (TACCAAGATTG)	BMP 4		BMP 4 materia prima	BMP 4 C S				Upload Only	<input type="checkbox"/>	Self	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	4
5	IonXpress_005 (CAGAGGAAAC)	BMP5		BMP 5 materia prima	BMP 5 C S				Upload Only	<input type="checkbox"/>	Self	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	5

Figura 10. Schermata acquisita dal server Torrent riportante le informazioni necessarie per la programmazione dello strumento Ion Chef.

Ogni passaggio deve essere ripetuto in modo identico anche per il secondo pool di librerie che verrà caricato sul secondo chip.

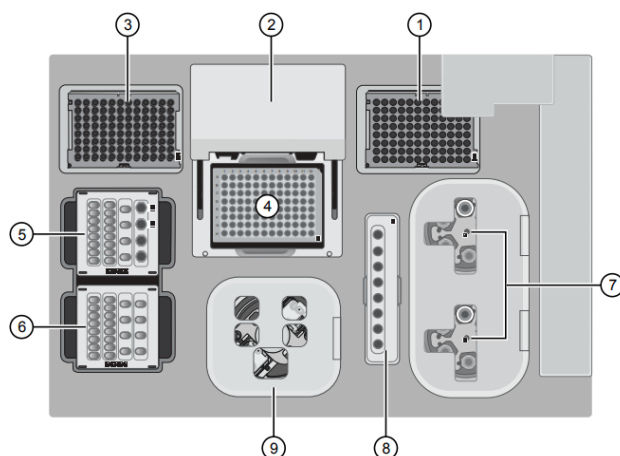
La tecnologia consente di identificare all'interno di un pool, più o meno vasto, ciascun campione e di distinguerlo dagli altri grazie al barcode che è stato legato precedentemente. Per tale motivo è fondamentale che i campioni che dovranno essere caricati sul chip 1 e che si troveranno all'interno del tubo 1 presentino barcode tutti diversi. Lo stesso ragionamento verrà applicato al secondo pool di librerie.

Terminati gli step di programmazione, si procede con la preparazione dello strumento *Ion Chef*<sup>TM</sup> (Figura 11).



Figura 11. Strumento Ion Chef prima del caricamento dei reagenti e dei materiali previsti dal protocollo.

Seguendo il manuale “*Ion 510<sup>TM</sup> & Ion 520<sup>TM</sup> & Ion 530<sup>TM</sup> Kit – Chef User Guide*” e la procedura guidata dello strumento, vengono caricati tutti i materiali contenuti nel kit “*Ion 510<sup>TM</sup> & Ion 520<sup>TM</sup> & Ion 530<sup>TM</sup> Kit – Chef*” esattamente nel modo indicato in Figura 12.



- ① **Waste pipette tip rack** – The position of the rack containing waste (used) pipette tips.
- ② **Automated heated cover** – Transfers the plate cover to the PCR reaction plate within the sample block. During thermal cycling, the heated cover applies thermal compression to seal the reaction plate and heats the cover to prevent condensation.
- ③ **New pipette tips** – The position of the rack containing unused pipette tips.
- ④ **Thermal cycler sample block** – Performs thermal cycling of the sequencing reactions on a 96-well PCR reaction plate.
- ⑤ **Reagents station** – The position on the instrument deck of the diluted libraries, NaOH, and the Ion 520™ & Ion 530™ Chef Reagents cartridge.
- ⑥ **Solutions station** – The position on the instrument deck of the Ion S5™ Chef Solutions cartridge, which is maintained at room temperature.
- ⑦ **Recovery centrifuges** – Twin stations that perform centrifugation of the ISPs during the recovery phase of template preparation.
- ⑧ **Enrichment station** – The position of the rack containing consumables for the enrichment of the template-positive ISPs.
- ⑨ **Chip-loading centrifuge** – Performs centrifugation of sequencing chips that have been mounted to chip-loading adapters and loaded with template-positive ISPs.

Figura 12. Schema di caricamento dello strumento Ion Chef: rappresentazione di tutti i materiali necessari e dello specifico alloggiamento.

Nella postazione numero 5 dovranno essere caricate le librerie. Qui si trova anche la postazione dei reagenti impiegati dallo strumento Ion Chef™, dell'NaOH e dei due tubi adibiti ai pool delle librerie. I due tubi dovranno essere rispettivamente caricati con 25 µL del corrispondente pool.

La *chip-loading centrifuge* viene caricata, seguendo il manuale, con i due chip. Il kit impiegato è "Ion 510™ Chip Kit" poiché viene scelto il chip 510, che avrà una sua specifica processività in termini di numero di reads.

Completato il caricamento di tutti i materiali, si potrà fare partire la corsa. Seguendo le istruzioni indicate nel manuale si sceglie di procedere *step by step* e di far partire la scannerizzazione del *deck* dello strumento. Infine, si imposta l'orario di fine corsa nelle opzioni di corsa, consentendo allo strumento di lavorare overnight e di concludere il processo in circa 12 ore (Figura 13).



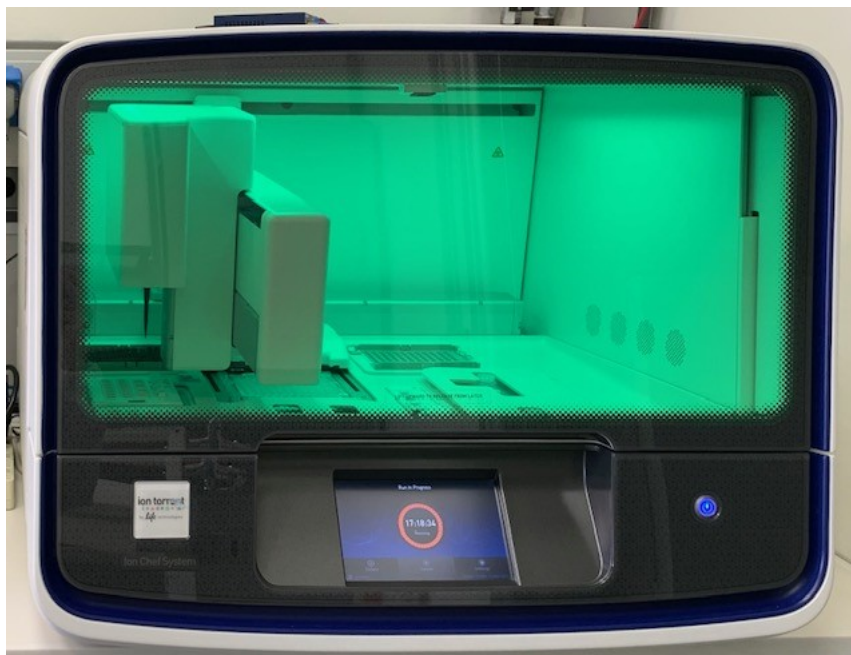


Figura 13. Strumento Ion Chef durante la corsa.

Lo strumento, prelevando i volumi di libreria che vengono forniti, sfrutterà la complementarietà fra le biglie e gli adattatori per attaccare i frammenti alle biglie stesse. Da questo momento può avere inizio la PCR in emulsione che determina un'amplificazione clonale del frammento X su tutta la superficie della biglia, a termine della quale sarà presente  $n$  volte. Le biglie vengono caricate all'interno dei pozzetti del chip (Figura 14), facendo sì che una singola biglia occupi un singolo pozzetto.



Figura 14. Ion 510 Chip.

Dopo aver riempito entrambi i chip lo strumento potrà essere svuotato dei reagenti usati. Anche i chip potranno essere rimossi e conservati, per essere impiegati nello step successivo. Infine, seguendo le istruzioni indicate nel manuale fornito dal produttore, lo strumento potrà essere sottoposto alla procedura di *cleaning*.

### 3.8 Sequenziamento

Prima di avviare lo step di sequenziamento effettivo, è necessario preparare lo strumento *Ion S5™ System (ThermoFisher Scientific™)* utilizzando il kit “*Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef™ (ThermoFisher Scientific™)*” e seguendo la guida all’utente fornita dal produttore. La preparazione inizia con l’inserimento di tutti i materiali necessari e contenuti nel kit nelle specifiche posizioni indicate in Figura 15 del manuale; questo include lo svuotamento del contenitore dei rifiuti e il suo reinserimento nella posizione designata, l’inserimento della cartuccia dei reagenti di sequenziamento, la posizione della bottiglia di *Wash Solution* e la sostituzione della bottiglia di *Cleaning Solution* se necessario.



Figura 15. Schema di organizzazione dei componenti dello strumento Ion S5.

Una volta inseriti tutti i componenti, viene avviato il protocollo di inizializzazione dello strumento (Figura 16). Questo consiste nella reidratazione della cartuccia di nucleotidi liofilizzati fornita e che verrà utilizzata nello step di sequenziamento. Una volta terminata la fase di inizializzazione, lo strumento potrà essere caricato con il primo chip da sequenziare. Lo strumento Ion S5 determina una sommersione della camera di sequenziamento con i vari reagenti, fra cui i nucleotidi che dovranno essere immessi nel processo di sequenziamento.



Figura 16. Strumento Ion S5.

Durante questo passaggio i frammenti amplificati clonalmente e distribuiti sulla superficie delle biglie verranno sequenziati per mezzo dell'incorporazione nucleotidica. Nel processo verranno inclusi anche i barcode e gli adattatori P1 inseriti nella fase di preparazione delle librerie. I primi vengono posti tra la *Library Key* e la read e si pongono come meccanismo distintivo per le reads di campioni differenti; mentre i secondi consentono l'adesione del frammento alla biglia di amplificazione. Accanto a questi elementi, viene inserito anche un altro frammento aggiuntivo necessario per distinguere le reads della libreria dalle reads del *Test Fragment*. Questo elemento viene indicato con il nome di *Library Key* ed è posto al 5' della sequenza, viene determinato nei primi otto flussi della corsa di sequenziamento e consiste in una sequenza nucleotidica nota (per esempio TCAG). Il risultato è illustrato in Figura 17:



Figura 17. Schermata tratta dal manuale *Torrent Suite*. Schema di organizzazione degli elementi fondamentali per il processo di sequenziamento.

Al termine del processo, lo strumento potrà essere nuovamente utilizzato procedendo con un'ulteriore fase di inizializzazione preparatoria al sequenziamento del secondo chip.

Terminati i sequenziamenti, seguendo il manuale fornito dal produttore si seguirà la procedura di *cleaning*.

### 3.9 Analisi dei dati di sequenziamento e rielaborazione successiva

Terminato il singolo processo di sequenziamento, in primo luogo, è necessario valutare i report relativi alla corsa di sequenziamento per ottenere informazioni sulla qualità dei dati e le sequenze ottenute. Questi dati sono visualizzabili nel *Torrent Server* accedendo alla specifica corsa. Qui si ritrova una serie di metriche qualitative per le reads non ancora allineate. Le informazioni sono riportate in Figura 18:

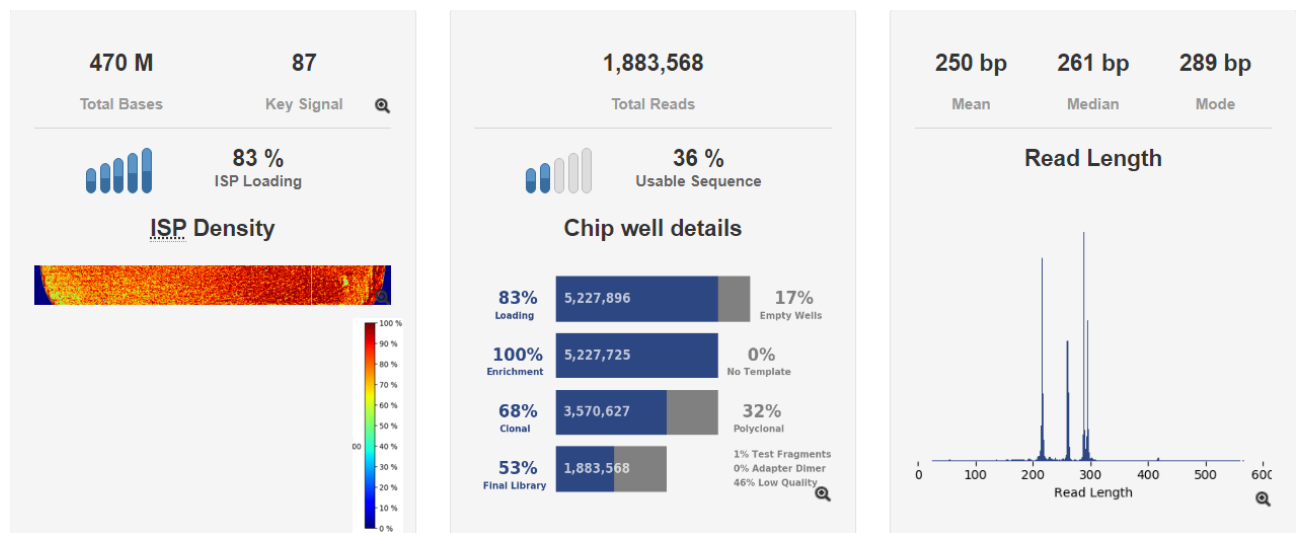


Figura 18. Schermata tratta da *Torrent Server*. Insieme delle metriche qualitative riferite al sequenziamento riportate nel *Run Report*.

L'andamento della corsa viene descritto in modo qualitativo dalla rappresentazione visiva del caricamento del chip e indicato come *ISP Loading Density*: il colore (rosso o blu), la sua intensità e la sua ripartizione descrivono la distribuzione di caricamento dei pozzetti sulla superficie del chip. Un parametro importante è la % di *ISP Loading*, che indica la percentuale di pozzetti del chip che contengono una sola *Ion Sphere Particle*. Altre metriche includono il numero totale di reads e la percentuale di reads utilizzabili, nonché le metriche di lunghezza delle sequenze, come la media, la mediana e la moda. Nel report *ISP Summary*, oltre ai valori già citati vengono indicate

le metriche riferite ai valori di *ISP* clonali e la percentuale di reads che definiscono la libreria finale. La caratteristica di clonalità viene raggiunta da una *ISP* quando tutti i suoi frammenti di DNA sono stati clonati a partire da un singolo frammento originale. Questi frammenti si possono definire identici e come tali rispondono all'unisono all'incorporazione nucleotidica.

Accanto a queste metriche, è inoltre possibile valutare i risultati del *Test Fragment*, *TF* (Figura 19). Questo consiste nel sequenziamento di una sequenza nucleotidica conosciuta, impiegata per monitorare le caratteristiche del sistema.

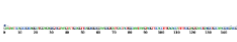
Test Fragment	Reads	Percent 50AQ17	Percent 100AQ17	Read length histogram
TF_1	7,830	90%	88%	

Figura 19. Schermata tratta da Torrent Server. Risultato del sequenziamento del Test Fragment.

Valutate le metriche qualitative, i dati di sequenziamento devono essere analizzati anche dal punto di vista delle sequenze. Questo può essere fatto utilizzando il *Server Ion Reporter* e seguendo il workflow per le analisi metagenomiche.

Una volta effettuato il login al server di *Ion Reporter*, come primo passaggio è necessario lanciare l'analisi che può essere fatta in modo manuale: andrà scelta la specifica *Research Application* e dovrà essere assegnato un nome identificativo. I campioni devono essere selezionati in numero maggiore o uguale a uno, a seconda del tipo di analisi che si vuole compiere. Una volta processata la richiesta, potranno essere visualizzati i parametri ottenuti.

Questo tipo di workflow sfrutta due database di riferimento, entrambi per il gene 16S: *Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1* e *Curated GreenGenes v13.5*. I database vengono impiegati per fare un confronto fra le sequenze ottenute e le sequenze già registrate.

All'interno della singola analisi metagenomica si può trovare la sezione riassuntiva (Figura 20), contenente informazioni varie sull'analisi stessa e sui parametri, così come le metriche delle reads classificate per tipo di primer; inoltre è presente la sezione dei risultati che contiene tutti i dati di identificazione delle reads.

Parameter	Value
File	IonXpress_D41_rawlib_basecaller.bam
Database	Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1; Curated Greengenes v13.5
Number of copies needed	5
Primers detected	Both ends
BP cutoff	150 - NOT in effect when using full coverage
Total number of reads	37890
Number of valid reads	31214
Number of reads ignored	10586 (due to low number of copies <5)
Mapped reads in sample	20628
Un-Mapped reads in sample	0
Analysis date	10/20/23, 1:40 AM

Primer name	# of mapped reads	# of valid reads	# of low copy number reads	# of un-mapped reads	# of forward found	# of forward full coverage	# of forward short	# of forward valid reads	# of reversed found	# of reversed full coverage	# of reversed short	# of reversed valid reads
V2	1021	1725	704	0	930	756	0	756	1237	969	0	969
V3	7435	10529	3094	0	9261	7730	0	7730	3092	2799	0	2799
V4	4516	7033	2517	0	4760	4395	0	4395	3053	2638	0	2638
V67	3287	4876	1589	0	3012	2269	0	2269	2914	2607	0	2607
V8	4369	7038	2669	0	3106	2678	0	2678	5288	4360	0	4360
V9	0	13	13	0	197	12	0	12	22	1	0	1

Figura 20. Schermata tratta da Torrent Server. Dettaglio della sezione riassuntiva

Tra i parametri ottenuti, una prima sezione riguarda gli indici di Alpha-diversity e di Beta-diversity (Figura 21) ottenuti dalla piattaforma QIIME.

**Analyses** Visualize Switch To ▾

Bres linea Staph  
View Sample Results: BFA\_25\_v2

Alpha/Beta Diversity Analysis with QIIME

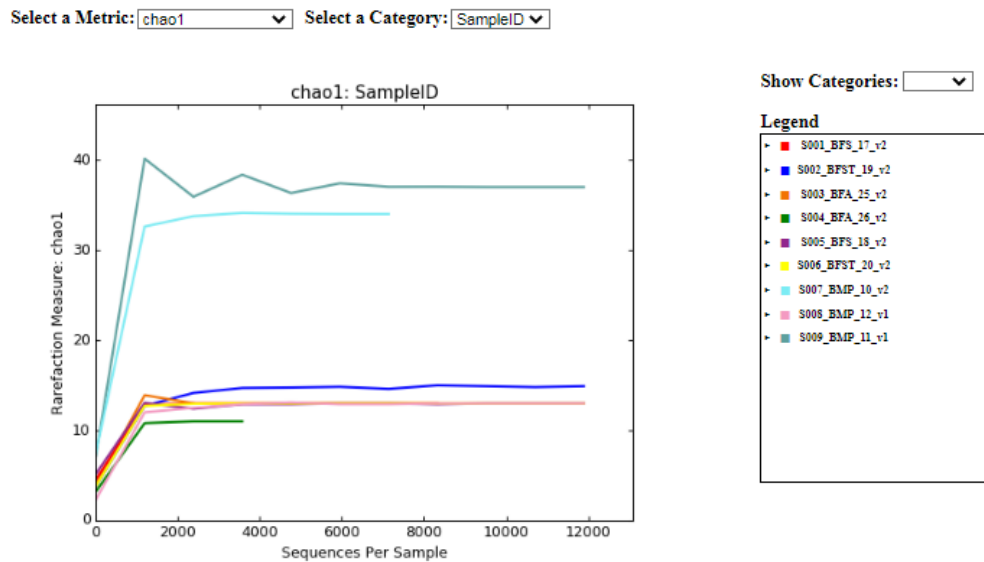
Ion Reporter leverages QIIME's open-source bioinformatics pipeline to produce diversity analyses and visualizations. Alpha diversity results describe the diversity within a single sample at the Species, Genus, and Family levels. Beta diversity results describe the diversity between multiple samples at the Species, Genus, and Family levels.

	Alpha Diversity		Beta Diversity			
			Euclidean	Manhattan	ChiSq	Bray-Curtis
By Species	Visualize		PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix
By Genus	Visualize		PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix
By Family	Visualize		PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix	PCOA Plot   PC Matrix

Figura 21. Schermata tratta da Torrent Server. Dettaglio degli indici descrittivi suddivisi per specie, genere e famiglia.

Il primo descrive la diversità all'interno di un campione singolo ai livelli tassonomici di specie, genere e famiglia. Il secondo descrive la diversità fra campioni multipli ai livelli di specie, genere e famiglia. Dunque nell'Alpha diversità si può visualizzare in un singolo campione quanto questo è diverso al suo interno e per fare ciò ci si serve di alcuni indici come l'indice di Shannon, l'indice di Chao e l'indice di Simpson. Il primo è

una misura quantitativa dell'abbondanza di una comunità; il secondo è una stima dell'abbondanza delle specie. Per ogni livello di interrogazione, specie o genere o famiglia, può essere anche visualizzato il corrispettivo *Rarefaction Plot* (Figura 22).



If the lines for some categories do not extend all the way to the right end of the x-axis, that means that at least one of the samples in that category does not have that many sequences.

SampleID	Seqs/Sample	chao1 Ave.	chao1 Err.	observed_species Ave.	observed_species Err.	shannon Ave.	shannon Err.	simpson Ave.	simpson Err.
S001_BFS_17_v2	10.0	4.533	nan	4.200	nan	1.820	nan	0.674	nan
S001_BFS_17_v2	1198.0	12.800	nan	12.800	nan	2.104	nan	0.673	nan
S001_BFS_17_v2	2386.0	13.000	nan	13.000	nan	2.108	nan	0.670	nan
S001_BFS_17_v2	3574.0	13.000	nan	13.000	nan	2.108	nan	0.673	nan
S001_BFS_17_v2	4762.0	13.000	nan	13.000	nan	2.108	nan	0.671	nan
S001_BFS_17_v2	5950.0	13.000	nan	13.000	nan	2.104	nan	0.670	nan
S001_BFS_17_v2	7138.0	13.000	nan	13.000	nan	2.107	nan	0.671	nan
S001_BFS_17_v2	8326.0	13.000	nan	13.000	nan	2.107	nan	0.671	nan
S001_BFS_17_v2	9514.0	nan	nan	nan	nan	nan	nan	nan	nan
S001_BFS_17_v2	10702.0	nan	nan	nan	nan	nan	nan	nan	nan
S001_BFS_17_v2	11890.0	nan	nan	nan	nan	nan	nan	nan	nan
S002_BFST_19_v2	10.0	3.800	nan	3.500	nan	1.596	nan	0.650	nan
S002_BFST_19_v2	1198.0	12.720	nan	11.900	nan	1.993	nan	0.687	nan
S002_BFST_19_v2	2386.0	14.150	nan	13.200	nan	1.996	nan	0.689	nan
S002_BFST_19_v2	3574.0	14.700	nan	14.400	nan	1.996	nan	0.686	nan
S002_BFST_19_v2	4762.0	14.750	nan	14.500	nan	1.989	nan	0.686	nan
S002_BFST_19_v2	5950.0	14.833	nan	14.800	nan	1.997	nan	0.687	nan

Figura 22. Schermata tratta da Torrent Server. Dettaglio della rappresentazione grafica del Rarefaction plot dell'indice di Chao per la categoria specie.

Quest'ultimo indica a quale livello di profondità si raggiunge il plateau della diversità del campione, dove con profondità si intende la grandezza del pool di sequenze cioè il numero di sequenze che si stanno analizzando.

Questo consente di comparare in modo ottimale i campioni poiché viene indicato il numero di sequenze al quale si raggiunge il massimo della diversità.

Anche per quanto riguarda il parametro della Beta diversità, è possibile identificare diversi indici descrittivi: la diversità di Bray-Curtis, la distanza di Manhattan, la distanza euclidea e la distanza del chi-quadrato. Il primo è una misura quantitativa della dimensione di una comunità. Di tutti questi indici possono essere visualizzati i plot corrispondenti definiti come *PCOA Plot* (figura 23).

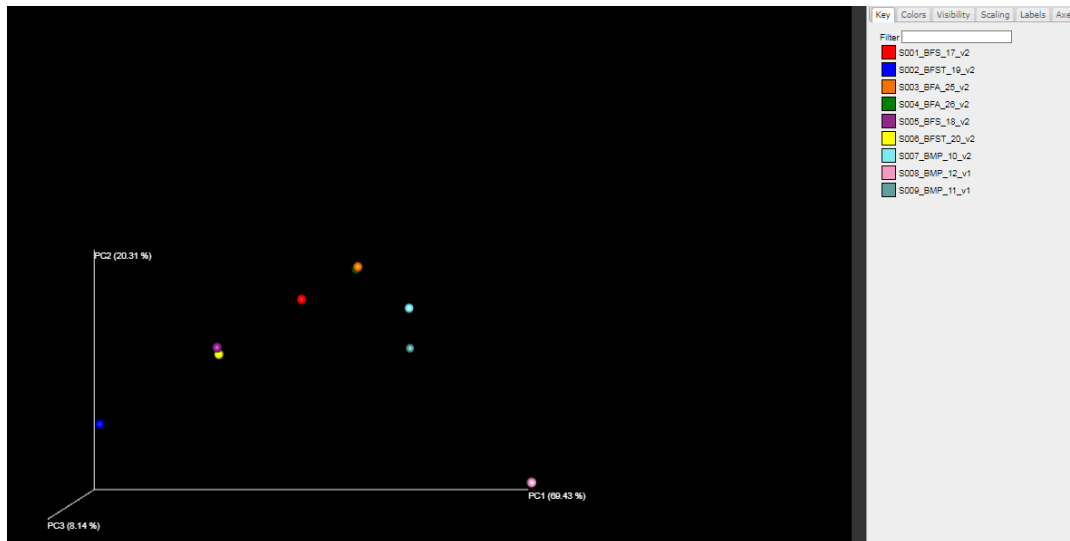


Figura 23. Schermata tratta da Torrent Server. Dettaglio della sezione dei risultati visualizzabili: PCOA plot.

Nella sezione dei risultati (Figura 24) i dati possono essere visualizzati per tipo di primer, con o senza *slash calls*, oppure per *consensus* che combina insieme i dati relativi a tutti i primer.

Results

Data View: By Primer with slash calls

Primer	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	% ID	Count	DB counters	F:R %	% of total reads	% of valid reads	% of mapped reads	% of mapped reads per primer	
<b>V2</b>								<b>1021</b>	<b>976 : 45</b>		<b>2.69</b>	<b>3.27</b>	<b>4.95</b>	<b>100</b>	
	Firmicutes							1021	976 : 45		2.69	3.27	4.95	100	
		Bacilli						1021	976 : 45		2.69	3.27	4.95	100	
			Lactobacillales					1021	976 : 45		2.69	3.27	4.95	100	
				Lactobacillaceae				925	920 : 5		2.44	2.98	4.45	90.6	
					Lactobacillus			925	920 : 5		2.44	2.98	4.48	90.6	
					(genus level ID only)			5	0 : 5		0.01	0.02	0.02	0.49	
					graminis			99.12 - 99.58	135 : 135 : 0		51.11 : 49.89	0.38	0.43	0.55	13.22
					sakei			99.58 - 100	785 : 785 : 0		45.61 : 54.39	2.07	2.51	3.81	78.69
				Leuconostocaceae				96	95 : 1		0.25	0.31	0.47	9.4	
					(family level ID only)			5	0 : 5		0.01	0.02	0.02	0.49	
				Leuconostoc				30	30 : 0		0.08	0.1	0.15	2.94	
					carosum			100 - 100	30 : 30 : 0		73.33 : 26.67	0.08	0.1	0.15	2.94
				Weissella				61	28 : 33		0.16	0.2	0.3	5.97	
					(genus level ID only)			35	0 : 35		0.09	0.11	0.17	3.43	
					konensis			100 - 100	28 : 28 : 0		30.77 : 69.23	0.07	0.08	0.13	2.95
<b>V3</b>								<b>7425</b>	<b>6623 : 802</b>		<b>19.62</b>	<b>23.82</b>	<b>36.04</b>	<b>100</b>	

Figura 24. Schermata tratta da Torrent Server. Dettaglio della sezione dei risultati visualizzabili.



Nella visualizzazione, a seconda del tipo di campione, si possono ritrovare i diversi livelli gerarchici di identificazione microbica. Possono essere anche indicate le singole specie, se il confronto con i database di riferimento lo permette. In caso di indecisione, il sistema non sceglie automaticamente una specie rispetto ad un'altra, ma al contrario riporta direttamente le diverse specie, tra le quali non è possibile individuare quella più sicura.

Tutte le volte in cui una read contiene più di una specie, con la specifica percentuale di rappresentatività, il sistema restituisce in automatico una *Slash Call*. Nella sezione di visualizzazione e di download dei risultati è possibile osservare in modo grafico una rappresentazione dei risultati. Questo può essere fatto tramite i *Krona Charts* (Figura 25), che possono essere manipolati a seconda del tipo di informazione desiderata.

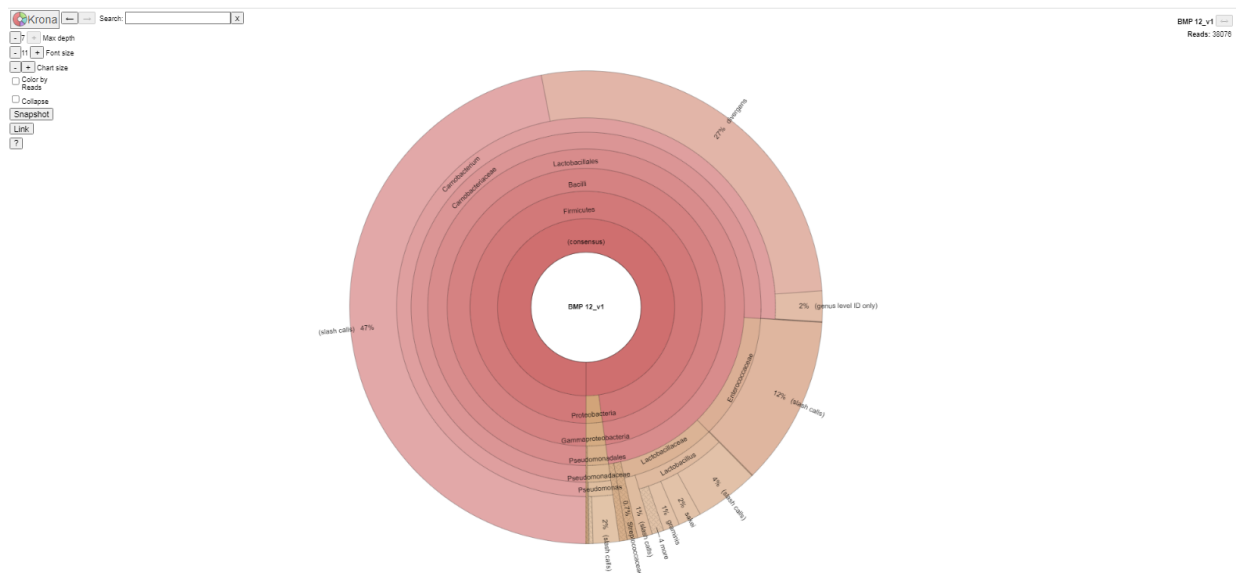


Figura 25. Schermata tratta da Torrent Server. Dettaglio della rappresentazione grafica tramite il grafico Krona della distribuzione dei risultati.

Infine, *Ion Torrent Server* permette di scaricare tutti i dati sotto forma di cartelle compresse. Le informazioni, una volta estrapolate, possono essere aperte come file di testo e rielaborate con il software Excel.

## **4 RISULTATI E DISCUSSIONI**

La caratterizzazione delle comunità microbiche residenti a livello superficiale della bresaola è stata realizzata tramite analisi NGS. Tale caratterizzazione è stata definita per ogni campione (da 1 a 12), per ogni stabilimento di produzione (A, B, C) e per ogni fase del processo produttivo (Materia Prima, Fine Salagione, Fine Asciugamento, Fine Stagionatura). I dati ottenuti dal sequenziamento sono stati elaborati dal software *Ion Reporter* (Thermo Fisher Scientific) e successivamente sono stati visualizzati tramite la forma *consensus*, combinando insieme i dati relativi al sequenziamento di tutte le regioni ipervariabili impiegate.

Valutate le metriche qualitative della corsa sul server *S5 Torrent Server* (Thermo Fisher Scientific), a conferma della corretta amplificazione clonale delle librerie e del loro caricamento sui chip magnetici, e il raggiungimento di una buona percentuale di reads utilizzabili, i dati devono essere analizzati anche dal punto di vista delle sequenze. Utilizzando il *Server Ion Reporter* e seguendo il workflow per le analisi metagenomiche i dati di sequenziamento possono essere valutati, in particolare il software considera valide le *OTU* con almeno 5 reads.

Questo tipo di workflow sfrutta due database di riferimento, entrambi per il gene 16S: *Curated MicroSEQ(R) 16S Reference Library v2013.1* e *Curated GreenGenes v13.5*. I database vengono impiegati dal software per fare un confronto fra le sequenze ottenute e le sequenze già registrate.

All'interno della singola analisi metagenomica si può trovare la sezione riassuntiva contenente informazioni varie sull'analisi stessa e sui parametri, così come le metriche delle reads classificate per tipo di primer; inoltre è presente la sezione dei risultati che contiene tutti i dati di identificazione delle reads.

La tecnologia consente di raggruppare le reads ottenute in cluster, che vengono generati sulla base di una certa percentuale di identità delle sequenze che si ritrovano all'interno. Tali cluster prendono il nome di *OTU* (*operational taxonomic units*). Le reads utilizzabili ottenute sono un totale di 1967559 con un minimo di 949 nel campione B2FS8 (campione dell'azienda B prelevato a fine sale) e un massimo di 617553 nel campione C1FST10 (campione dell'azienda C prelevato a fine stagionatura). Valutando le varie fasi produttive nella materia prima, le reads rilevate mostrano un minimo di 2707 nel campione A2MP4 e un massimo di 55617 nel campione C2MP12; nella fase di fine salagione il minimo registrato è di 949 nel campione B2FS8, mentre il massimo di 66979 lo si ritrova nel campione A2FS4. La

fase di fine asciugamento mostra un minimo di 3760 reads nel campione A1FA1 e un massimo di 66913 nel campione B2FA8; infine nella fase di fine stagionatura nel campione A1FST2 è stato rilevato un minimo di 11134 e nel campione C1FST10 un massimo di 617553. Queste reads si traducono in un totale di 676411 OTU, con un minimo di 211 nel campione B2FS8 e un massimo di 242291 del campione C1FST10. È stata quindi riscontrata una corrispondenza tra i campioni con i valori minimi e massimi sia di reads che di OTU.

Tra i parametri ottenuti, in una prima sezione il software restituisce gli indici di Alpha-diversity e Beta-diversity sulla base della pipeline bioinformatica open source di QIIME, che permette di produrre analisi e visualizzazioni della diversità.

Concluso il sequenziamento dei campioni, sono stati estratti i dati di interesse relativi al numero di *OTU* ottenute per ogni genere e per ogni specie, per ognuno dei 48 campioni sequenziati. Le informazioni estrapolate sono state rielaborate con il software Microsoft Excel. In primo luogo, è stata definita la somma del numero delle *OTU* ricavate, rispetto allo specifico campione, per ogni genere o per ogni specie riscontrati. Questo ha consentito di ricavare il totale complessivo delle *OTU* ottenute in tutti i generi (o le specie), riferite al campione in esame. Secondariamente, dai singoli valori ottenuti sono state ricavate le abbondanze relative espresse in percentuale. Queste sono state calcolate andando a considerare lo specifico contributo del numero di *OTU*, relativo al genere (o specie) di interesse rispetto al campione considerato, moltiplicato per 100 e successivamente diviso per il totale delle *OTU* definito sopra. Dunque, l'abbondanza relativa è ciò che permette di comprendere quanto influisce il genere X (o la specie X) sul totale ottenuto. Esprimendola in valore percentuale, ovviamente il totale sarà riportato al 100%. Per cui dall'insieme dei generi (o delle specie) ottenuti, per lo specifico campione, si potrà dedurre in che percentuale il genere (o la specie) influisce sul totale delle identificazioni effettuate.

Il cutoff utilizzato è stato scelto in base a dati riportati in letteratura, nello specifico è stato utilizzato un cutoff dello 0,1% poiché riportato in letteratura come cutoff comune nelle rielaborazioni successive al sequenziamento e frequente nelle analisi metagenomiche del 16S rRNA su matrici alimentari (Cauchie *et al.*, 2020; Peruzzy *et al.*, 2019; Giello *et al.*, 2017).

Nella valutazione dei risultati e nella seguente discussione di questi si è deciso di suddividere i 48 campioni analizzati in base alla fase del processo produttivo allo scopo

di evidenziare possibili differenze nella distribuzione microbica dovuta all'effetto dei processi produttivi.

Nella presentazione dei risultati sono stati utilizzati come rappresentazione grafica istogrammi, boxplot e PCoA; i primi mostrano visivamente la distribuzione delle specie in funzione della loro abbondanza relativa nelle diverse classi di campioni, gli altri invece permettono di definire la diversità intercorrente tra i diversi campioni.

Come detto sopra il software restituisce gli indici di Alpha-diversity e Beta-diversity ottenuti sfruttando la pipeline bioinformatica open source di QIIME, di conseguenza la diversità all'interno di ciascun campione è stata valutata utilizzando l'Alpha-diversity (Richness R), un indice che spiega la variabilità dei taxa all'interno dei singoli campioni. In Figura 26 tale indice è stato valutato per tutti i campioni di ogni fase del processo produttivo. La diversità è stata calcolata con la metrica *Observed-Species*, che descrive l'unicità delle *OTUs* presenti in ogni campione.

La bontà del sequenziamento è stata valutata in relazione al fatto che le curve, corrispondenti a ogni campione, hanno raggiunto il plateau; questo significa che la quasi totalità delle specie presenti è stata rilevate infatti anche se il numero di letture delle reads aumenta la curva non cresce, ma appunto arrivata a plateau.

Select a Metric:  Select a Category:

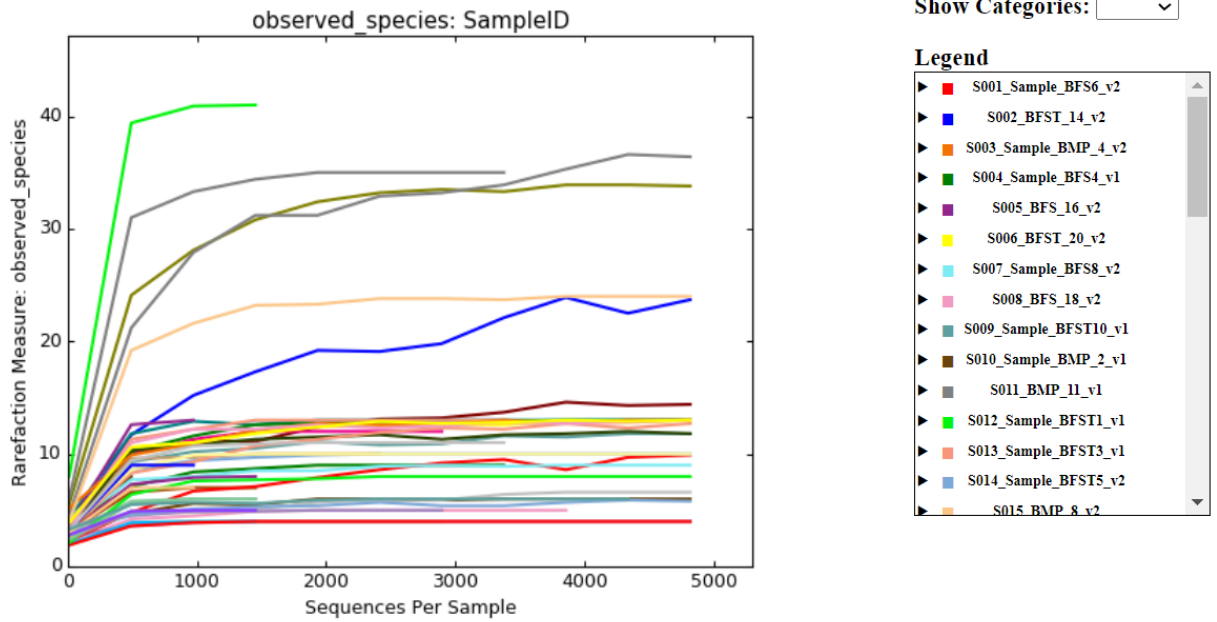


Figura 26. Indice di Alpha-diversity relativo a tutti i campioni presi in esame.

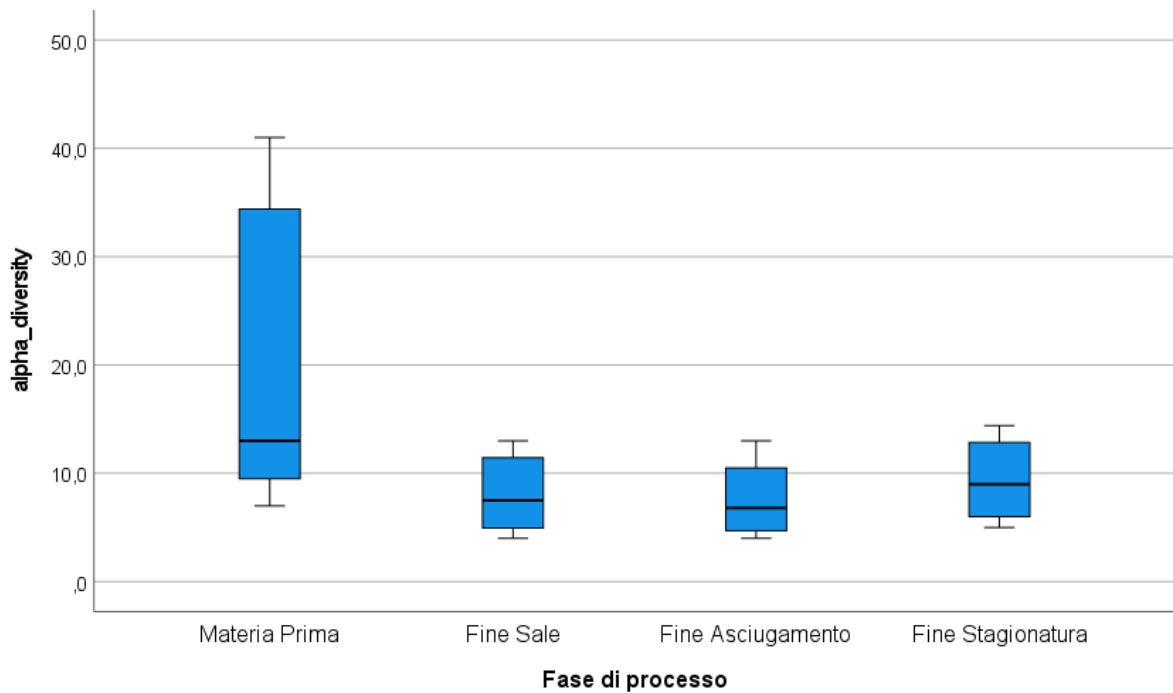


Figura 27. Boxplot relativo alla diversa distribuzione in relazione alla fase di processo produttivo.

In Figura 27 è evidente la differenza che intercorre tra la materia prima, che mostra una diversità interna molto elevata, e le altre fasi del processo produttivo, in cui l'inter-

diversità è molto inferiore e risulta essere piuttosto simile e costante tra i campioni. Questo andamento è in linea con l'appiattimento della diversità batterica esercitata dalle diverse fasi del processo produttivo che portano ad una progressiva diminuzione delle specie microbiche in grado di crescere sulla superficie del prodotto; infatti l'iniziale abbassamento delle temperature e la presenza di sale, e la successiva perdita di acqua dal prodotto durante le fasi calde portano ad una selezione di microrganismi psicrotrofi e alotolleranti.

## 4.1 Materia prima

Per questa prima fase sono stati analizzati 3 campioni per ogni azienda e l'analisi è stata svolta su due repliche della produzione così da avere campioni in doppio per ogni azienda. Sono stati quindi sottoposti ad analisi un totale di 12 campioni di materia prima.

Si sottolinea il fatto che le aziende A e B hanno sottoposto a lavorazione lo stesso lotto di materia prima proveniente dal medesimo fornitore, di conseguenza quando ci si riferirà all'azienda A si sottintenderà anche la B.

I campioni sottoposti ad analisi provengono dalla materia prima che è stata sottoposta, nelle diverse aziende, alle varie fasi del processo produttivo per essere trasformata in bresaola.

I risultati sono stati valutati inizialmente mediante l'indice di Alpha-diversity selezionando la metrica "*Observed-Species*" il cui grafico è riportato in Figura 28. L'indice spiega la variabilità dei taxa all'interno dei singoli campioni raggruppati secondo precise variabili categoriche, in questo caso la diversità è stata calcolata con la metrica *Observed-Species* che descrive l'unicità delle *OTUs* presenti in ogni campione.

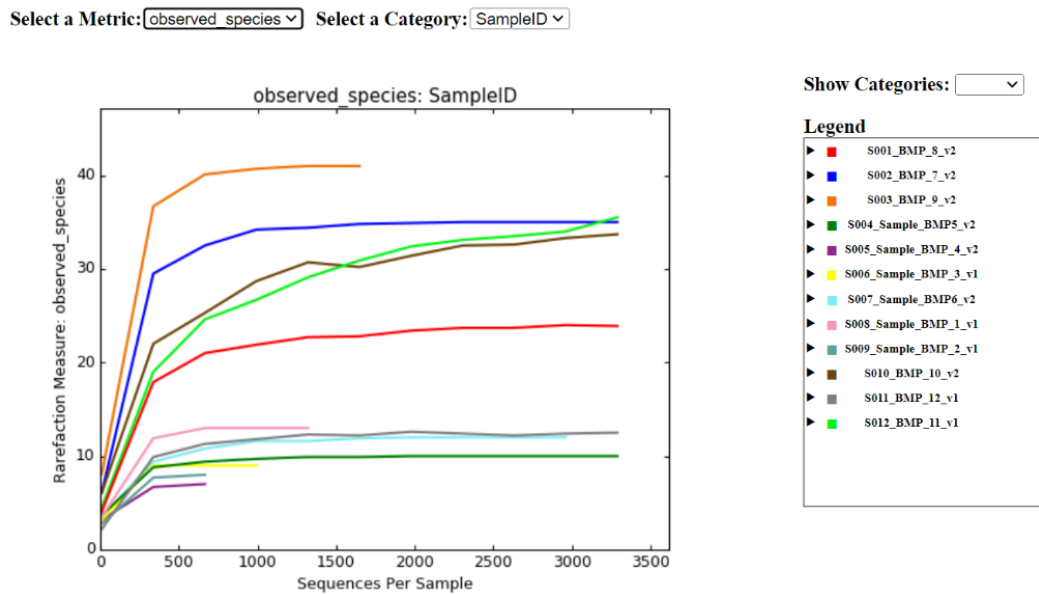


Figura 28. Grafico rappresentante l'Alpha-diversity, mediante l'indice Observed-Species, in riferimento alla materia prima.

Si può osservare che l'indice di Alpha-diversity è rappresentato da una curva, la quale raggiunge il plateau in ogni campione, questo significa che almeno il 90% delle specie presenti sono state rilevate ed, inoltre, è stata rilevata la maggior parte della diversità presente; infatti, all'aumentare del numero di letture delle reads non sono aumentate le specie identificate.

Questo permette di avere un'idea sulla profondità del sequenziamento. La differenza tra un campione e l'altro sta nella ricchezza in specie batteriche che lo caratterizza, per esempio il campione A2MP4 presenta il minor numero di specie rilevate, sono 7, e infatti la sua curva risulta essere la più bassa, al contrario il campione C1MP9 presenta la curva più alta in quanto è il campione più ricco in diversità biologica, le specie in questo caso sono 40.

Dai risultati del sequenziamento è emerso che la materia prima è caratterizzata da un'ampia varietà di microrganismi, che spaziano da alteranti o patogeni a batteri utili poiché in grado di apportare al prodotto finito caratteristiche organolettiche legate allo sviluppo del colore, del sapore e degli aromi tipici.

La presenza di questi microrganismi, riportati in tabella e nell'istogramma con le rispettive abbondanze relative percentuali (Tabella 5 e Figura 29), trova riscontro anche con i dati in letteratura che li riportano in qualità di elementi comuni del microbiota associato alla carne di bovino (Nortjé & Naudé, 1981).



	A1	A1	A1	A2	A2	A2	C1	C1	C1	C2	C2	C2
	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7	MP8	MP9	MP10	MP11	MP12
<i>Serratia_rubidaea</i>	0	0,55	0,68	0	0	1,32	0	0	0	0	0	0
<b>Lactobacillus_algidus</b>	<b>0,73</b>	<b>0,66</b>	<b>1,06</b>	<b>57,38</b>	<b>24,37</b>	<b>43,91</b>	<b>1,63</b>	<b>2,78</b>	0	0,07	0,04	0
<i>Pseudomonas_deceptionensis</i>	8,89	6,89	3,39	0	0	0	2,95	0,75	1,96	0,98	0,89	0,53
<i>Lactobacillus_sakei</i>	1,09	0	0	0	0,4	0,17	13,93	13,28	13,41	9,31	4,87	5,04
<b>Carnobacterium_divergens</b>	0,58	0	0	0	0,22	0,17	0	0	0,67	<b>26,71</b>	<b>26,1</b>	<b>86,22</b>
<i>Leuconostoc_gelidum</i>	4,15	0,98	2,13	0,87	0,58	0,3	0,55	0,4	1,84	0,17	0,08	0
<i>Pseudomonas_orientalis</i>	5,24	3,83	12,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas_fragi</i>	9,18	10,18	6,78	0	0	0	2,15	0,5	3,52	0,43	0,32	0
<b>Lactococcus_piscium</b>	<b>64,68</b>	<b>74,07</b>	<b>70,18</b>	<b>3,72</b>	<b>43,44</b>	<b>24,16</b>	<b>0,94</b>	<b>1,49</b>	<b>6,26</b>	<b>11,15</b>	<b>9,6</b>	<b>0,28</b>
<i>Lactobacillus_graminis</i>	0,44	0	0	0	0	0	4,8	4,9	3,3	7,27	4,27	3,57
<i>Leuconostoc_carnosum</i>	0,36	0	0	0,66	0,11	0,2	3,64	7,7	0,34	19,5	39,33	1,22
<i>Pseudomonas_sp.</i>	0,36	0	0,77	0	0	0	0	0	2,23	0	0	0
<i>Pseudomonas_savastanoi</i>	0,36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Leuconostoc_gasicomitatum</b>	<b>3,93</b>	<b>2,84</b>	<b>2,9</b>	<b>22,4</b>	<b>19,14</b>	<b>12,08</b>	<b>0,25</b>	<b>0,16</b>	<b>0,28</b>	<b>0,07</b>	<b>0,45</b>	<b>0</b>
<i>Obesumbacterium_proteus</i>	0	0	0	0	0	1,01	0	0	0	0	0	0
<i>Leuconostoc_kimchii</i>	0	0	0	0	0,64	0,2	0	0	0	0	0	0
<i>Brochothrix_thermosphacta</i>	0	0	0	0,55	4,03	0	2,92	0,37	7,26	5,83	2,2	0
<i>Hafnia_paralvei</i>	0	0	0	0	0	0,61	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella_beninensis</i>	0	0	0	14,43	7,07	15,86	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus_equorum</i>	0	0	0	0	0	0	0,72	0,13	0	0	0	0
<i>Psychrobacter_sanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,28	0	0	0
<i>Arcobacter_skirrowii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,67	0	0	0
<i>Lactobacillus_delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0,58	0	0	0,44	0,33	1,01
<i>Pseudomonas_chlororaphis</i>	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0
<i>Leifsonia_sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0,88	0,19	0,73	0	0	0
<i>Myroides_guanonis</i>	0	0	0	0	0	0	0,17	0	2,23	0	0	0
<i>Sphingomonas_echinoides</i>	0	0	0	0	0	0	1,49	0,36	0,34	0	0	0
<b>Propionibacterium_acnes</b>	0	0	0	0	0	0	<b>32,69</b>	<b>52,41</b>	<b>15,14</b>	<b>0,07</b>	<b>0,52</b>	0
<i>Aeromonas_fluvialis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,34	0	0	0
<i>Methylobacterium_jeotgali</i>	0	0	0	0	0	0	0,22	0	0	0	0	0
<i>Ralstonia_insidiosa</i>	0	0	0	0	0	0	3,17	1,4	0,89	0	0,19	0
<i>Turicibacter_sanguinis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,24	0	0	0	0
<i>Myroides_phaeus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1,06	0	0	0
<i>Psychrobacter_cibarius</i>	0	0	0	0	0	0	0,19	0	0	0	0	0
<i>Wautersiella_sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,78	0	0	0
<i>Acinetobacter_gyllenbergii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3,69	0	0	0
<i>Clostridium_putrefaciens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,28	0	0	0
<i>Acinetobacter_soli</i>	0	0	0	0	0	0	0,17	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus_lylae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas_caeni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	4,64	0	0	0
<i>Paenalcaligenes_hominis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,95	0	0	0
<i>Streptococcus_thermophilus</i>	0	0	0	0	0	0	1,16	0,12	0	0,37	0,2	0,77
<i>Comamonas_jiangduensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,84	0	0	0
<i>Vagococcus_carniphilus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,01	0	0	0
<i>Pseudomonas_bacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1,12	0	0	0

<b>Ralstonia_mannitolilytica</b>	0	0	0	0	0	0	0,72	0,77	1,17	0	0	0
<b>Leclercia_adecarboxylata</b>	0	0	0	0	0	0	1,24	0	0,34	0	0	0
<b>Weissella_kandleri</b>	0	0	0	0	0	0	3,2	4,61	0	0	0	0
<b>Providencia_rustigianii</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,56	0	0	0
<b>Undibacterium_sp.</b>	0	0	0	0	0	0	0,44	0	0	0	0	0
<b>Listeria_monocytogenes</b>	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0
<b>Acinetobacter_ursingii</b>	0	0	0	0	0	0	0,61	0,08	1,01	0	0	0
<b>Acinetobacter_johnsonii</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	9,16	0,18	0,16	0
<b>Clostridium_haemolyticum</b>	0	0	0	0	0	0	12,03	0	0	0	0	0
<b>Comamonas_kerstersi</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,07	0	0	0
<b>Janthinobacterium_lividum</b>	0	0	0	0	0	0	0,19	0	0	0	0	0
<b>Acinetobacter_lwoffii</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,73	0,22	0,05	0
<b>Anaplasma_phagocytophilum</b>	0	0	0	0	0	0	0,44	0	0	0	0	0
<b>Weissella_korensis</b>	0	0	0	0	0	0	2,12	6,52	0	0	0	0
<b>Clostridium_perfringens</b>	0	0	0	0	0	0	1,66	0	0	0	0	0
<b>Arcobacter_cryaerophilus</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,63	0	0	0
<b>Clostridium_algidicarnis</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,28	0	0	0
<b>Acinetobacter_sp.</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,85	0,77	0,14	0
<b>Staphylococcus_xylosum</b>	0	0	0	0	0	0	1,74	0,67	0,28	0	0	0
<b>Peptostreptococcus_russellii</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1,51	0	0	0
<b>Carnobacterium_maltaromaticum</b>	0	0	0	0	0	0	0,14	0	0	0,2	0	0
<b>Fusobacterium_necrophorum</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,39	0	0	0
<b>Lactococcus_lactis</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,47	7,6	0,52
<b>Lactobacillus_curvatus</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,85	0,37	0,61
<b>Leuconostoc_holzappelii</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,71	0,21	0
<b>Kocuria_salsicia</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17	0,81	0
<b>Chryseobacterium_carnis</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0,05	0
<b>Kocuria_varians</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0
<b>Leuconostoc_mesenteroides</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,37	0,2	0
<b>Psychrobacter_arenosus</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,22	0,06	0
<b>Arthrobacter_psychrochitiniphilus</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,72	0,24	0
<b>Corynebacterium_testudinis</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,87	0,12	0
<b>Lactobacillus_helveticus</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,14
<b>Acinetobacter_radioresistens</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,34	0	0
<b>Serratia_rubidaea</b>	0	0,55	0,68	0	0	1,32	0	0	0	0	0	0

Tabella 5. Tabella delle abbondanze relative percentuali delle specie batteriche identificate nella materia prima.

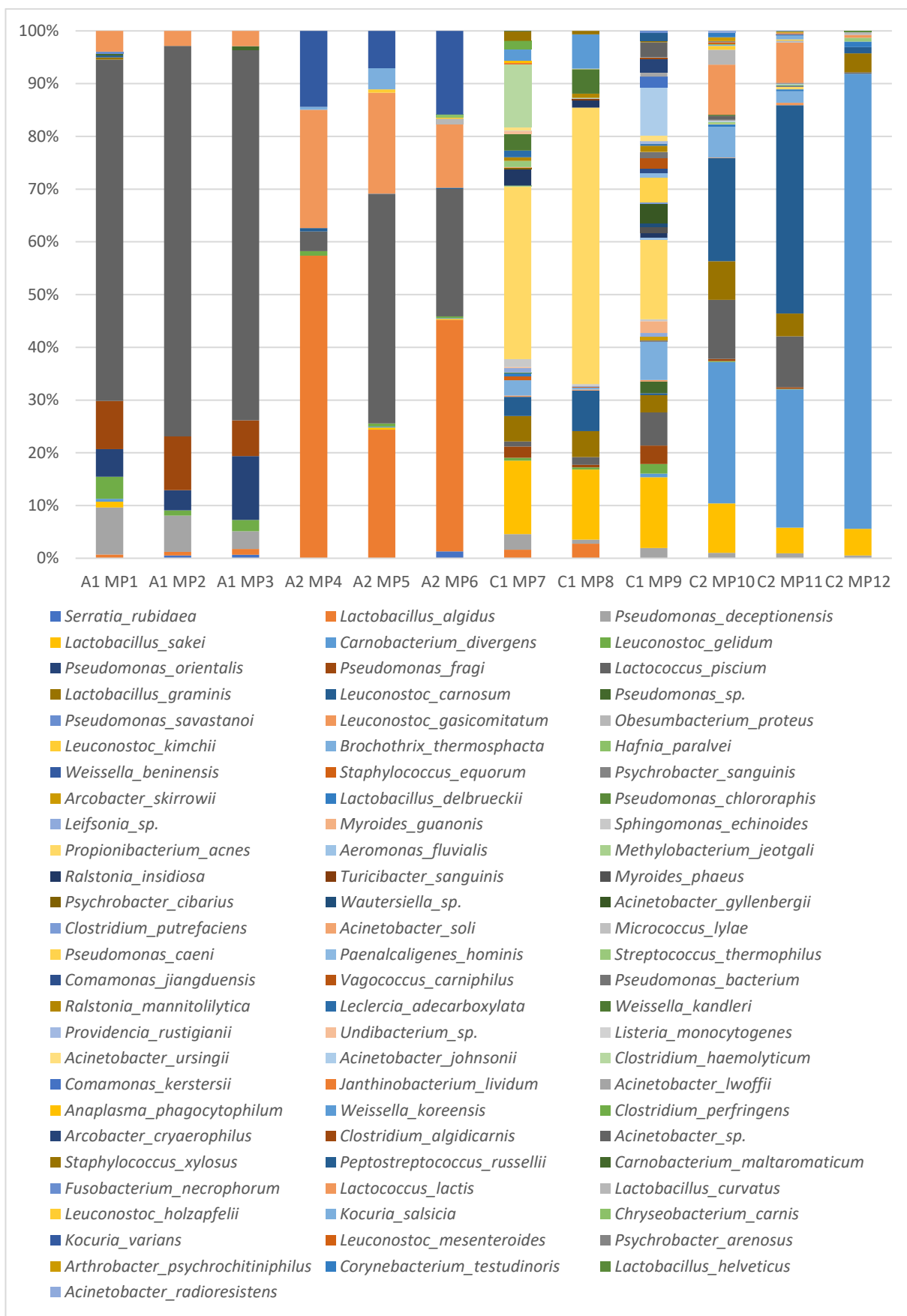


Figura 29. Grafico delle abbondanze relative percentuali in riferimento alle specie batteriche rilevate nella materia prima.

Dalla tabella sopra riportata è evidente l'abbondanza di specie rilevate grazie al sequenziamento NGS, di seguito sono riportati i rispettivi generi di appartenenza: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Anaplasma*, *Arcobacter*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Hafnia*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Myroides*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*.

La materia prima si caratterizza dalla presenza maggioritaria di batteri lattici (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacteria* e *Enterococcus*) che sono infatti il gruppo presente con la più alta abbondanza relativa; questo dato non sorprende in quanto questi microrganismi sono tipicamente presenti negli ambienti di macellazione e sulla cute degli animali, di conseguenza la contaminazione dei muscoli, fino a quel momento sterili, è molto frequente durante la fase di scuoiatura.

Generalmente i batteri lattici sono benefici per gli alimenti e vengono utilizzati per la fermentazione di varie preparazioni alimentari, dove contribuiscono al sapore, alla consistenza, alla conservabilità e alla sicurezza, data la capacità di alcuni ceppi di produrre batteriocine che inibiscono la crescita di batteri patogeni, come *Listeria monocytogenes* (Saraoui *et al.*, 2016; Toldrá, 2022). Alcune specie possono, al contrario, svolgere un ruolo significativo nell'alterazione degli alimenti e per quanto riguarda la carne i cambiamenti indesiderati includono l'inverdimento e la possibile formazione di sapori sgradevoli, come di muffa, di formaggio, di malto, di acido o di burro. Questi batteri possono anche produrre grandi quantità di un esopolisaccaride che causa la formazione di slime sulle carni (Remenant *et al.*, 2015).

In particolare, nei campioni analizzati le specie *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc gasicomitatum* e *Lactococcus piscium* sono presenti nelle materie prime di tutte le aziende prese in esame. In letteratura questi microrganismi sono riportati come tipici alteranti della carne bovina, portando a variazioni di colore e produzione di odori anomali (Säde, 2011; Vihavainen & Björkroth, 2007; Saraoui *et al.*, 2016).

Per quanto riguarda il genere *Leuconostoc*, normalmente presente nella flora lattica autoctona dei prodotti carnei, la specie *L. carnosum* è stata ritrovata in prevalenza nell'azienda C, mentre nelle aziende A e B è presente con un'abbondanza relativa decisamente più bassa o addirittura assente in alcuni campioni; la specie *Leuconostoc*

*mesenteroides* è stata rilevata solo nella replica 2 dell'azienda C. Entrambe queste specie sono state riportate in letteratura come batteri alteranti la carne bovina, in particolare la seconda è stata riportata nell'Encyclopedia of Food Microbiology, 1999 (pagine 1183-1194), in quanto presente in prodotti a base di carne stagionata e in grado di portare a decolorazione della stessa, cattivi odori, sapori, nonché formazione di slime (Chen *et al.*, 2022; Björkroth *et al.*, 1998). *Leuconostoc carnosum*, invece, è un microrganismo che può essere utilizzato anche per la sua attività antilisterica, produce infatti leucocina, una batteriocina in grado di inibire la crescita del patogeno, senza però produrre componenti aromatiche indesiderate nei prodotti a base di carne (Budde *et al.*, 2003).

Un altro genere di batteri lattici fortemente presente è quello dei *Lactobacillus*. Andando a discutere le varie specie si nota un'elevata abbondanza relativa della specie *Lb. algidus* nella replica 2 dell'azienda A, è presente anche nella replica 1 delle aziende A e C ma a livelli decisamente più bassi. Esso è un tipico alterante della carne in quanto, in determinate condizioni, è in grado di formare putrescina, con i conseguenti odori non desiderabili (Schirmer *et al.*, 2009; Säde *et al.*, 2020).

*Lactobacillus delbrueckii*, ritrovato solamente nell'azienda C, viene studiato per la sua capacità nel ridurre la crescita di psicrotrofi e coliformi, ma anche di patogeni su carne bovina (Senne & Gilliland, 2003); in un altro studio del 2020 Hernández-Aquino *et al.* hanno isolato ceppi di *Lb. delbrueckii* da carne bovina ed analizzato il loro effetto sulla crescita di due batteri di riferimento (*Salmonella* sp. ed *Escherichia coli*), hanno poi riscontrato che cinque isolati hanno mostrato un effetto inibitorio su entrambi i batteri. È stato rilevato anche il genere *Latilactobacillus*, in particolare *Latilactobacillus sakei* caratterizza maggiormente l'azienda C e con abbondanze relative piuttosto basse lo si ritrova anche nell'azienda A; *Latilactobacillus graminis*, si riscontra in modo più significativo nella replica 1 delle aziende A e C e nella replica 2 dell'azienda C; mentre *Latilactobacillus curvatus* è stato rilevato solo nella replica 2 dell'azienda C. Questi batteri lattici sono spesso utilizzati come starter per la produzione di prodotti carnei fermentati (Janßen *et al.*, 2018), sono inoltre stati studiati in molteplici lavori come potenziali culture protettive poiché in grado di inibire la crescita di microrganismi alteranti e migliorare la shelf-life di prodotti di carne bovina (Zhang *et al.*, 2018; Castellano *et al.*, 2008; Castellano *et al.*, 2010; Chaillou *et al.*, 2014). Queste specie sono state rilevate dal sequenziamento come appartenenti al genere *Lactobacillus*,

come si può vedere nelle tabelle, ma nel 2020 è stata aggiornata la tassonomia di questo genere (Zheng *et al.*, 2020).

Del genere *Lactococcus* è stata rilevata la specie *Lactococcus lactis*, presente solo nella replica 2 dell'azienda C; questo microrganismo è stato studiato nel 2016 da Comi *et al.* che nel loro lavoro hanno dimostrato come *Lc. lactis* e *L. sakei* siano in grado di ridurre la crescita di *L. mesenteroides*, il responsabile di alterazioni di prodotti carnei, come formazione di un colore verde, di slime e di vari composti derivati da fermentazione degli zuccheri e degradazione di composti azotati.

Ai batteri lattici appartengono anche i generi *Carnobacterium*, *Weissella* e *Vagococcus* che sono stati ritrovati sui campioni analizzati. Anche per questi microrganismi molti studi ne evidenziano la doppia natura, infatti in base al substrato in cui si ritrovano possono svolgere un'azione protettiva oppure un'azione alterante. Per quanto riguarda il genere *Carnobacterium* è stata riscontrata la specie *C. divergens* in alcuni campioni di materia prima delle repliche 1 e 2 dell'azienda A, della replica 1 dell'azienda C e in tutti i campioni della replica 2 dell'azienda C; questo microrganismo, come i precedenti, può agire come alterante in caso di conservazione impropria, grazie alla tolleranza alle temperature di congelamento e scongelamento, o come coltura protettiva, a seconda del ceppo e del prodotto alimentare (Bevilacqua *et al.*, 2016; Leisner *et al.*, 1995; Di Gioia *et al.*, 2016; Laurson *et al.*, 2005).

Sul genere *Weissella* sono pochi i lavori riscontrati in bibliografia e riguardano una produzione alimentare tipica della Corea, il kimchi, un piatto di verdure fermentate con spezie. Anche per il genere *Vagococcus* i dati in letteratura sono scarsi, sono stati trovati studi che confermano la possibile presenza di questo microrganismo sulle carni bovine ma non sull'effetto che può avere la sua crescita (Shewmaker *et al.*, 2004).

*Streptococcus thermophilus* è stato rilevato nei campioni dell'azienda C anche se con una bassa abbondanza relativa, questo microrganismo è solitamente utilizzato come starter, insieme a *Lb. delbrueckii*, nella fermentazione dello yogurt. Uno studio ha analizzato la possibilità di utilizzare metanolo-acetone, prodotto da *S. thermophilus* durante la fermentazione del latte, per valutare la stabilità del colore, la variazione del pH e la crescita microbica a temperature di stoccaggio di 0 e 10°C di carne bovina. Dallo studio è emerso che l'estratto di questa sostanza può avere un'utilità nel prolungare la durata della conservazione della carne bovina fresca, riducendo i fattori responsabili del deterioramento del colore, come ad esempio l'attività microbica (Sikes

& Rolle, 1987); si potrebbe quindi presupporre un suo effetto benefico sulle matrici carnee.

È emersa la presenza anche del genere *Propionibacterium* con abbondanze relative molto alte nella replica 1 dell'azienda C, questo microrganismo lo si può facilmente ritrovare nel tratto digestivo dei ruminanti, per cui, anche in questo caso, una contaminazione della carne fresca durante le fasi di macellazione potrebbe essere la ragione della sua elevata presenza. In letteratura è stata riscontrata la conferma della possibile presenza di questo microrganismo sulla carne bovina (Gray & Johnson, 1976), ma non sugli effetti che potrebbero derivare da una sua crescita, essendo però un eterofermentante in grado di metabolizzare carboidrati, lattato e piruvato in una miscela di propionato, acetato, succinato e anidride carbonica, potrebbe facilmente portare ad alterazione dei prodotti carnei.

La materia prima proveniente dalle diverse aziende si caratterizza anche per la presenza dei generi *Brochothrix* e *Pseudomonas*, tipici microrganismi alteranti. Entrambi sono stati riscontrati nei campioni dalle aziende A e C.

Le abbondanze relative sono variabili per il genere *Pseudomonas* a seconda delle specie rilevate; *P. deceptionensis*, *P. orientalis* e *P. fragi* caratterizzando soprattutto i campioni della replica 1 dell'azienda A, mentre *P. caeni* quelli della replica 1 dell'azienda C. Questi microrganismi sono molto comuni nelle carni fresche in quanto presenti nell'acqua e negli ambienti di macellazione, inoltre molte specie sono psicotrofe e per questo responsabili di alterazioni delle carni durante i periodi di refrigerazione (Watson *et al.*, 2023; Wickramasinghe *et al.*, 2021).

Allo stesso modo il microrganismo *B. thermosphacta* è comunemente associato ad alterazione di carni fresche e stagionate, in cui produce diacetile e acidi grassi dal metabolismo degli zuccheri, dando origine a odori acidi o di muffa (De W Blackburn, 2006).

Grazie al sequenziamento è stato rilevata la presenza anche del genere patogeno *Clostridium*, in particolare le specie *C. haemolyticum* e *C. perfringens* nei campioni della replica 1 dell'azienda C. Entrambi questi microrganismi si trovano solitamente nel tratto digestivo dei bovini per cui una contaminazione della carne fresca può facilmente avvenire durante le fasi di macellazione (Macheak, 1978; Jiang *et al.*, 2021; Jeong *et al.*, 2017).

I campioni dell'azienda C sono caratterizzati dalla presenza di numerosi microrganismi identificati con percentuali di abbondanze relative molto basse, pertanto il loro microbiota risulta essere molto variegato.

A seguito del sequenziamento sono stati riscontrati generi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, tuttavia le abbondanze relative che sono state riportate sono piuttosto basse. Di questa famiglia sono stati riscontrati i generi *Hafnia*, *Obesobacterium*, *Serratia* e *Leclercia*, i primi riscontrati nell'azienda A, mentre l'ultimo nella replica 1 dell'azienda C. La presenza di questi microrganismi può essere giustificata da una probabile contaminazione in fase di processo di macellazione, durante la quale è possibile che accidentalmente si vada a rompere il sacco dei visceri dell'animale (Manganelli *et al.*, 1993). I batteri appartenenti a questa famiglia possono svolgere un ruolo chiave nel deterioramento degli alimenti, grazie alla loro capacità di metabolizzare gli aminoacidi in composti volatili maleodoranti, come le diammine e i composti solforici (Remenant *et al.*, 2015).

In riferimento alla famiglia delle *Micrococcaceae*, invece, possono essere citati dei generi che trovano riscontro con i dati ottenuti, fra questi *Kocuria*, *Micrococcus* e *Arthrobacter* (Cornejo *et al.*, 1992). I batteri del genere *Kocuria* si trovano in diversi ambienti e come riportato da alcuni autori (Ramos *et al.*, 2021), i microrganismi appartenenti a questo genere sono in grado di produrre vari enzimi, tra i quali catalasi e proteasi. Sono state inoltre segnalate interazioni con altri microrganismi che aumentano la produzione enzimatica e quindi i composti volatili negli alimenti.

Tra le fonti di contaminazione microbica della carne fresca, il sale è senza dubbio quella principale non solo in quanto ingrediente, ma anche come veicolo tra l'ambiente, gli operatori e il prodotto (Cornejo *et al.*, 1992). Poiché la produzione di bresaola annovera tra le sue diverse fasi quella della salagione, il sale risulta un elemento critico e di possibile veicolazione di batteri, che potrebbe influire sulle caratteristiche organolettiche del prodotto, ma al tempo stesso inibire lo sviluppo di microrganismi ritenuti alteranti. I generi che hanno trovato corrispondenza con i campioni analizzati sono: *Acinetobacter*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (Satari *et al.*, 2021). Il primo è un genere che viene spesso associato ad alterazione di carni bovine refrigerate in quanto sono microrganismi in grado di crescere a basse temperature andando a degradare acidi organici e aminoacidi (Robinson & Batt, 2014). Al contrario il genere *Staphylococcus*, e nello specifico la specie *S. xylosus*, viene comunemente utilizzato



come coltura starter, insieme a *S. carnosus*, per lo sviluppo del colore e del sapore durante la fermentazione della carne (Stavropoulou *et al.*, 2018). *S. xylosus*, accoppiato a *S. equorum*, viene utilizzato come coltura protettiva nei confronti di *Penicillium nordicum* in alcune produzioni carnee (Cebrián *et al.*, 2023).

Alcuni dei generi ritrovati nei campioni sottoposti ad analisi possono essere definiti appartenenti a un gruppo di batteri tipicamente isolati in ambienti marini, al cui interno si caratterizzano generi differenti e altrettante capacità metaboliche (Lin and Shieh, 2006). Fra i generi che sono stati riscontrati si citano *Pseudoalteromonas* della famiglia delle *Pseudoalteromonadaceae*, *Methylobacterium* della famiglia delle *Methylobacteriaceae*, *Chryseobacterium* della famiglia delle *Flavobacteriaceae*, *Undibacterium* della famiglia delle *Oxalobacteraceae*, *Leifsonia* della famiglia delle *Microbacteriaceae*.

## 4.2 Fine salagione

Per questa fase e le successive, sono stati analizzati 2 campioni per ogni azienda e l'analisi è stata svolta, anche in questo caso, su due repliche della produzione; i campioni totali sottoposti ad analisi sono 12.

L'analisi dei campioni di carne dopo la salagione ha permesso di ottenere dati che mostrano una sostanziale differenza rispetto a quelli ottenuti dalla materia prima. Durante questa fase, infatti, i tagli di carne sono mantenuti a temperatura di refrigerazione e cosparsi con una miscela di sale, spezie, nitriti e nitrati, questi sono fattori che vanno ad inibire la crescita di molti microrganismi ed inattivarne altri.

In Figura 30 è riportato il grafico dell'indice di Alpha-diversity dei 12 campioni analizzati a fine salagione; anche in questo caso si è riusciti a sequenziare tutta la diversità biologica presente nei campioni, in quanto le curve associate ad ognuno di questi ultimi hanno raggiunto il plateau, l'unica eccezione la si può notare nel campione A2FS4 che mostra un andamento molto irregolare e risulta quindi essere un valore outlier. Nonostante ciò, il numero di specie identificate in questo campione è risultato in linea con gli altri.

In questo grafico è possibile notare come il numero di specie osservate (asse y) sia decisamente inferiore a quello del grafico precedente, infatti anche dai risultati del sequenziamento si è notata una drastica diminuzione in specie rilevate dalla materia

prima, che presentava un totale di 74 specie, ai campioni di fine salagione, che ne mostravano solo 18. Questo risultato è coerente con la fase di processo a cui ci si riferisce, in quanto i campioni sono stati analizzati dopo un periodo a basse temperature e cosparsi di sale che ha portato inevitabilmente all'inibizione di microrganismi sensibili a queste condizioni.

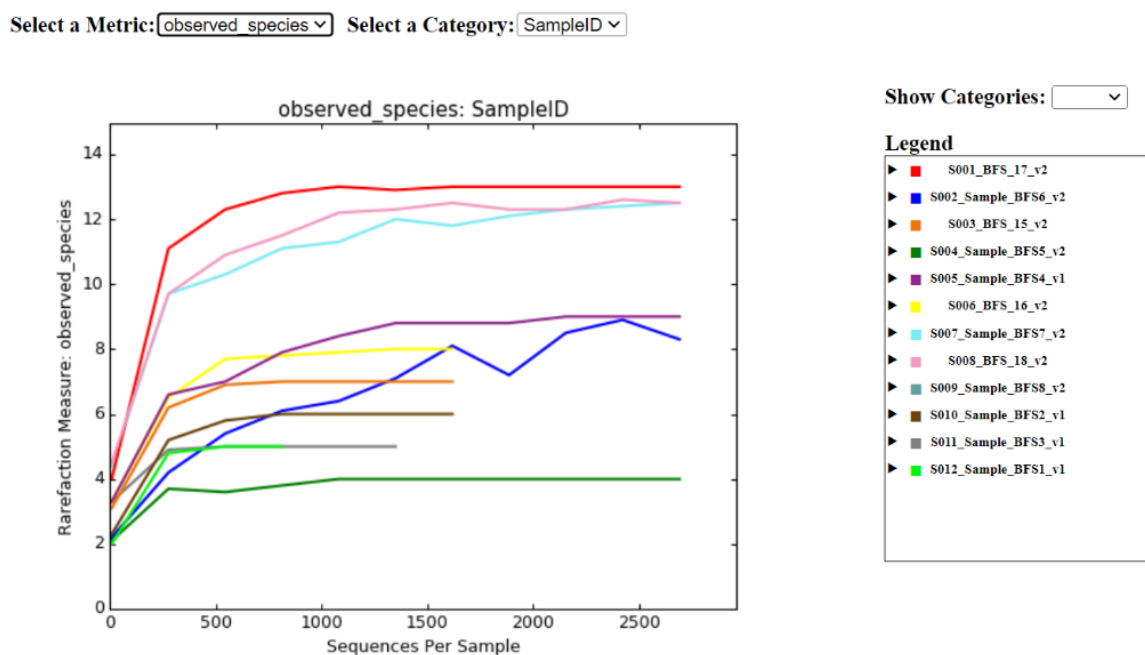


Figura 30. Grafico rappresentate l'Alpha-diversity, mediante l'indice Observed-Species, in riferimento alla fase di fine salagione.

Anche dalla valutazione dei dati riportati in Tabella 6 e in Figura 31 sottostanti è possibile notare come la microflora sia drasticamente diminuita rispetto all'analisi precedente. Il microbiota si caratterizza di microrganismi che sono riusciti a crescere nonostante le condizioni di basse temperature e alte concentrazioni di sale, questi sono soprattutto *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus graminis* e *Leuconostoc carnosum*, ma anche *Weissella koreensis* e *Weissella kandleri*, essi vengono quindi definiti microrganismi alotolleranti e psicotrofi. Per altre specie invece l'abbondanza relativa è diminuita, sottolineando il fatto che le condizioni avverse ne abbiano rallentato la crescita, le specie batteriche in questo caso sono *Lactobacillus algidus*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum*, queste nella materia prima erano invece le specie maggiormente presenti, insieme alla specie *Lactococcus piscium* la cui crescita è stata completamente inibita (Leroi *et al.*, 2012). Essendo questi tutti

microrganismi alteranti ciò significa che la fase di salagione è in grado di svolgere un'azione di selezione nei confronti dei batteri alteranti e va invece a favorire soprattutto i microrganismi utili.

È interessante sottolineare come altri microrganismi alternati abbondantemente presenti nella materia prima non vengano più ritrovati dopo questa fase, i principali generi sono *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*, così come il genere *Clostridium*.

L'azienda A non mostra abbondanze relative significative per altre specie batteriche; al contrario le aziende B e C si caratterizzano per la presenza considerevole delle specie *Lactobacillus algidus*, *Weissella koreensis* e *Weissella kandleri*, il primo è un alterante dei prodotti carnei, ma la sua abbondanza relativa è notevolmente diminuita rispetto a quella relativa alla materia prima.

L'azienda B, inoltre, è l'unica a riportare la presenza di *Latilactobacillus curvatus* e *Agrilactobacillus composti* con abbondanze relative piuttosto alte; il primo è noto per la sua capacità protettiva nei confronti dei batteri alteranti (Castellano *et al.*, 2008), mentre per il secondo non sono stati trovati dati in bibliografia relativi né alla sua presenza su prodotti carnei né su possibili effetti che potrebbe avere su questi.

Sono poi state rilevate altre specie microbiche presenti, ma tutte con abbondanze relative estremamente basse, come *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus termophilus* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Si sottolinea che, alla scadenza di fine salagione, tutte le aziende si caratterizzano per la presenza di *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus graminis* e *Leuconostoc carnosum*, batteri lattici che sono impiegati come starter nei prodotti carnei per le loro potenzialità come colture protettive e tecnologiche (Zagorec & Champomier-Vergès, 2017; Budde *et al.*, 2003).

#OTU Table	A1	A1	A2	A2	B1	B1	B2	B2	C1	C1	C2	C2
	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5	FS6	FS7	FS8	FS9	FS10	FS11	FS12
Lactobacillus_algidus	0,52	0,36	0	0,02	2,22	0,2	21,47	5,69	1,65	0,82	1,42	3,99
Lactobacillus_sakei	55,58	60,5	12,6	8,16	50,23	53,61	16,47	29,38	50,8	59,63	50,02	49,7
Leuconostoc_gelidum	0	0,96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leuconostoc_kimchii	1,46	0,54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactobacillus_graminis	41,71	37,27	7,24	8,32	18,2	20,38	9,09	18,01	25,97	25,4	24,83	23,41
Leuconostoc_carnosum	0,73	0	79,91	83,01	28,83	19,37	11,67	3,32	18,91	12,45	10,43	11,3
Leuconostoc_gasicomitatum	0	0,36	0	0	0	0	0,16	0	0,34	0,27	0	0
Staphylococcus_carnosus	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactobacillus_composti	0	0	0,25	0,12	0	0,17	0,35	2,37	0	0	0,37	0,22
Lactobacillus_sp.	0	0	0	0	0	0,14	0,8	0	0	0	0,54	0,38
Weissella_koreensis	0	0	0	0	0	0,59	27,86	31,28	1,54	0,88	7,05	7,63
Lactobacillus_curvatus	0	0	0	0	0,52	5,4	0	0	0,8	0,27	0,37	0,33
Weissella_kandleri	0	0	0	0	11,15	9,95	0	0	0	0	2,41	1,74
Vagococcus_penaei	0	0	0	0	0,77	0	0	0	0	0	0,55	0,39
Leuconostoc_mesenteroides	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,27	0	0
Lactobacillus_delbrueckii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,38
Streptococcus_thermophilus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,86	0,5
Lactobacillus_helveticus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,15	0,03

Tabella 6. Tabella delle abbondanze relative percentuali delle specie batteriche identificate nella carne dopo la fase di salagione.

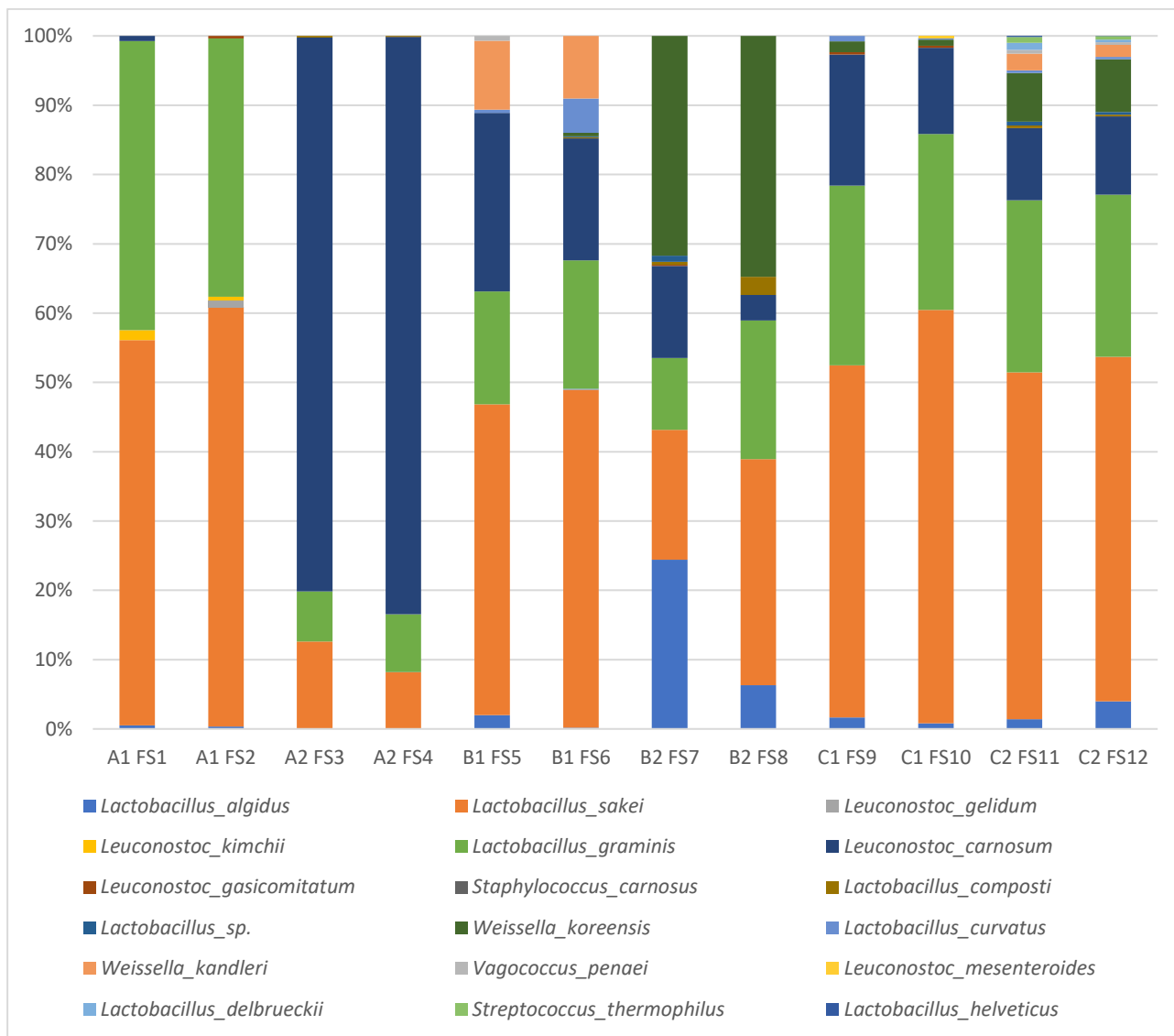


Figura 31. Grafico delle abbondanze relative percentuali in riferimento alle specie batteriche rilevate nella carne dopo la fase di salagione.

### 4.3 Fine asciugamento

I risultati ottenuti dal sequenziamento dei campioni prelevati dopo la fase di asciugamento mostrano un'ulteriore riduzione della varietà microbica, dalle 18 specie rilevate nella fase precedente il numero si è ridotto a 14, con abbondanze relative che vanno da un massimo di 61,18% a un minimo di 0,14%. La stessa considerazione si deduce anche dalla valutazione dell'Alpha-diversity riportata graficamente in Figura 32.

Select a Metric:  Select a Category:

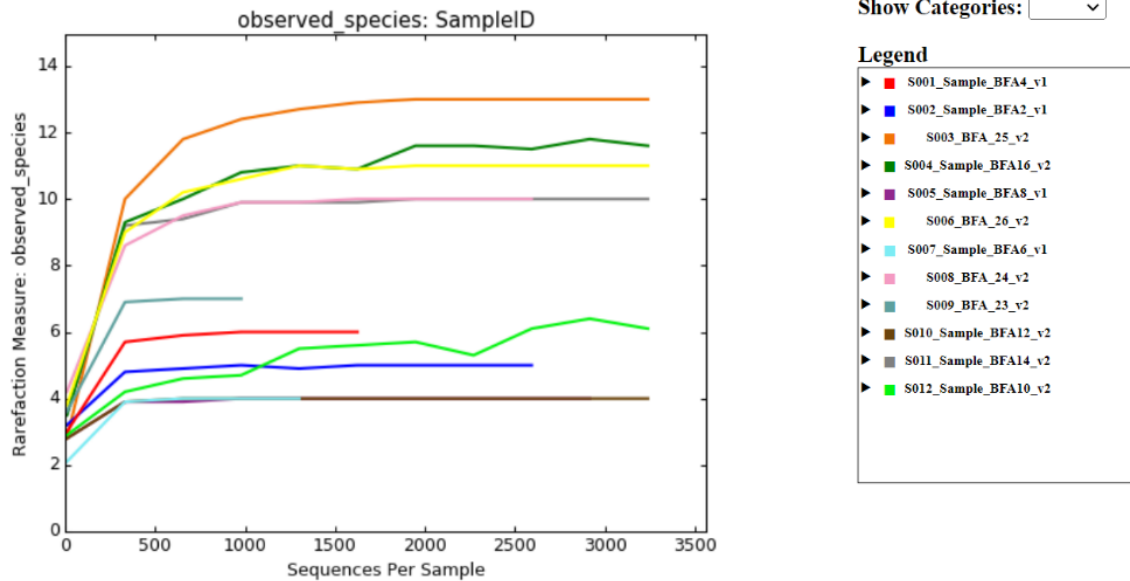


Figura 32. Grafico rappresentate l'Alpha-diversity, mediante l'indice Observed-Species, in riferimento alla fase di fine asciugamento.

Similmente a quanto osservato nella fase precedente il numero di specie identificate è piuttosto basso. Tutte le curve hanno raggiunto il plateau, ad eccezione delle curve corrispondenti ai campioni A2FA3 e B2FA8 che presentano un andamento irregolare (valori outlier). Il numero di specie identificate è risultato compreso tra 4 dei campioni A1FA1, A1FA2, A1FA3 e A2FA4, e 13 specie identificate nel campione C2FA11.

Questa fase di processo si caratterizza per temperature più alte della precedente al fine di consentire una rapida disidratazione del prodotto una volta insaccato e legato. Anche in questo caso tutti i campioni presentano abbondanze relative molto alte per le specie *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus graminis* e *Leuconostoc carnosum* (Tabella 7 e Figura 33).

Nell'azienda A non sono state rilevate altre specie presenti con abbondanze relative rilevanti, mentre le aziende B e C si differenziano dalla precedente per la presenza di *Lactobacillus curvatus* e *Weissella koreensis*, ma anche per *Lactobacillus algidus* e *L. malefermentans* due microrganismi alteranti presenti con abbondanze relative piuttosto basse.

Le aziende B e C, che nella fase precedente si distinguevano dall'azienda A anche per la presenza di *Agri lactobacillus composti* e *L. curvatus*, ora presentano un'abbondanza relativa significativa massima di 6,15% solo per la specie *L. curvatus*.

In questa fase, diversamente dalla precedente non è stata rilevata la presenza delle specie *Leuconostoc gelidum* e *Staphylococcus carnosus*.

Sono state rilevate altre specie, ma con abbondanze relative estremamente basse; tra queste è possibile citare *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Vagococcus penaei*.

#OTU Table	A1 FA1	A1 FA2	A2 FA3	A2 FA4	B1 FA5	B1 FA6	B2 FA7	B2 FA8	C1 FA9	C1 FA10	C2 FA11	C2 FA12
<i>Lactobacillus algidus</i>	0,41	0,3	0	0	0	1,04	1,95	1,35	1,01	2,67	0,26	0,39
<i>Lactobacillus sakei</i>	52	45,61	32,68	27	51,39	61,21	58,73	58,21	57,1	56,72	61,18	56,31
<i>Lactobacillus graminis</i>	47,19	49,82	21,96	16,67	23,82	23,95	17,21	18,33	26,67	22,19	24,2	22,68
<i>Leuconostoc carnosum</i>	0,41	4,27	44,77	55,99	18,43	12,28	13,99	15,13	9,17	10,52	6,45	12,44
<i>Lactobacillus composti</i>	0	0	0,5	0,35	0	0	0,33	0,37	0	0	0,32	0
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0	0	0	0	6,15	1,16	0,66	0,65	2,93	2	2,04	1,63
<i>Weissella koreensis</i>	0	0	0	0	0,21	0,37	5,43	4,14	0,82	1,67	2,84	4,49
<i>Weissella kandleri</i>	0	0	0	0	1,07	0,97	0	0	0	0,19	0,8	1
<i>Vagococcus penaei</i>	0	0	0	0	0,19	0,26	0	0	0	0	0,17	0
<i>Lactobacillus sp.</i>	0	0	0	0	0,44	0,45	0	0	0	0	0,14	0,21
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,7	0,4	0,26
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,29	3,11	1	0,18
<i>Lactobacillus helveticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,22	0	0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0,39

Tabella 7. Tabella delle abbondanze relative percentuali delle specie batteriche identificate nella carne dopo la fase di asciugamento.

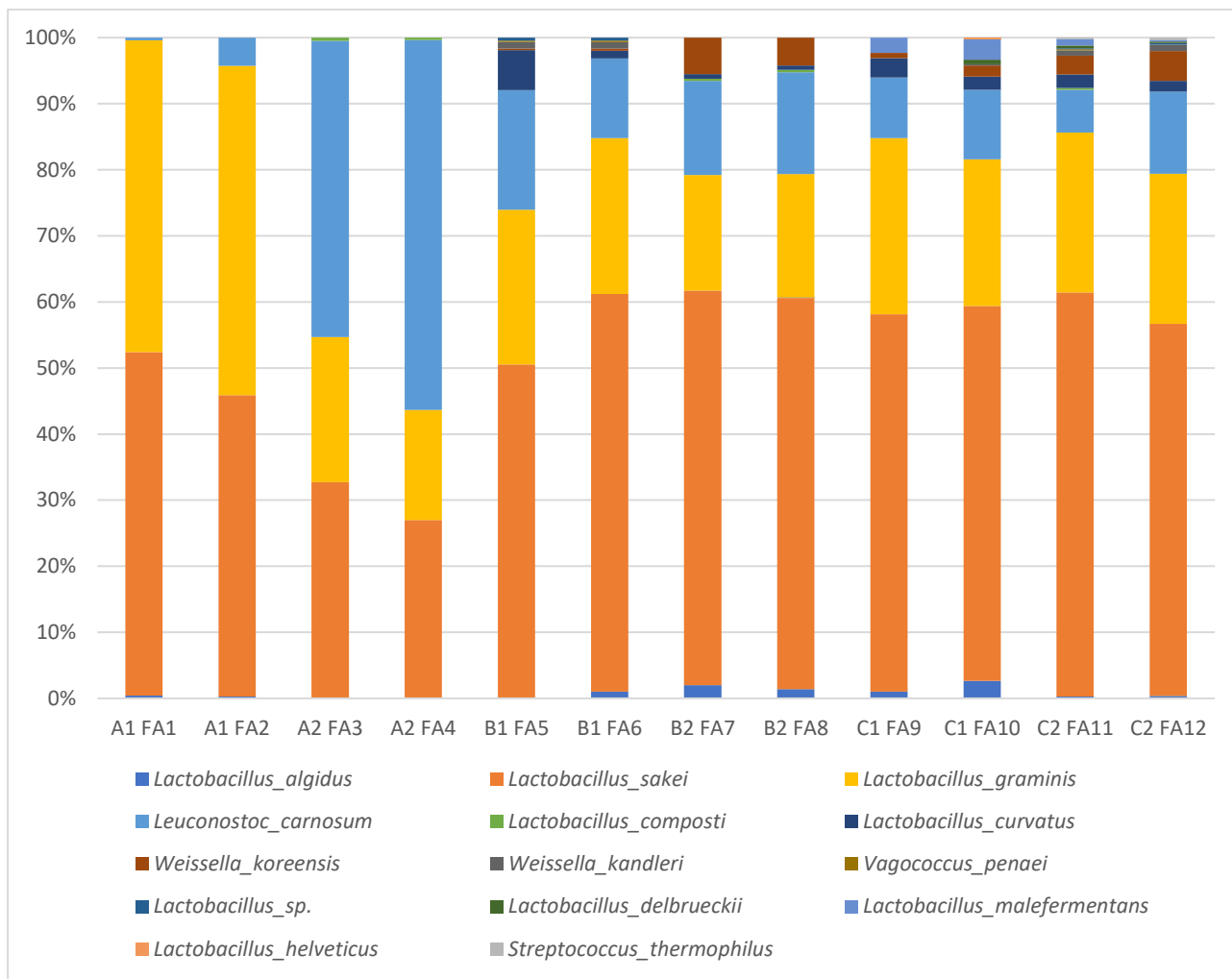


Figura 33. Grafico delle abbondanze relative percentuali in riferimento alle specie batteriche rilevate nella carne dopo la fase di asciugamento.

## 4.4 Fine stagionatura

I campioni analizzati dopo l'ultima fase del processo, in cui il prodotto subisce un'ulteriore perdita d'acqua, hanno mostrato una caratterizzazione microbica che si era già cominciata a delineare dopo la fase di salagione.

In Figura 34 è rappresentata l'Alpha-diversity relativa ai campioni analizzati a fine stagionatura ed, escludendo la curva riferita al valore outlier del campione C1FST10 che presenta un andamento anomalo, tutte le altre mostrano un andamento regolare, che partendo da zero aumenta fino ad arrivare al plateau. Il numero di specie identificate per ciascun campione è risultato compreso tra 3 del campione A1FST2 e 12 specie del campione C1FST10.



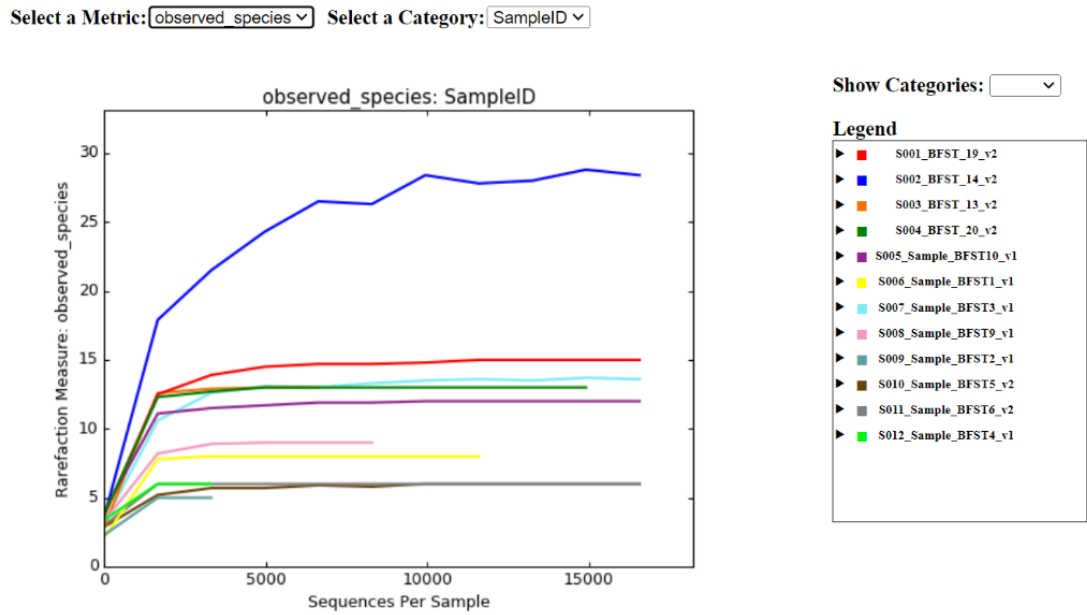


Figura 34. Grafico rappresentate l'Alpha-diversity, mediante l'indice di XX, in riferimento alla fase di fine stagionatura.

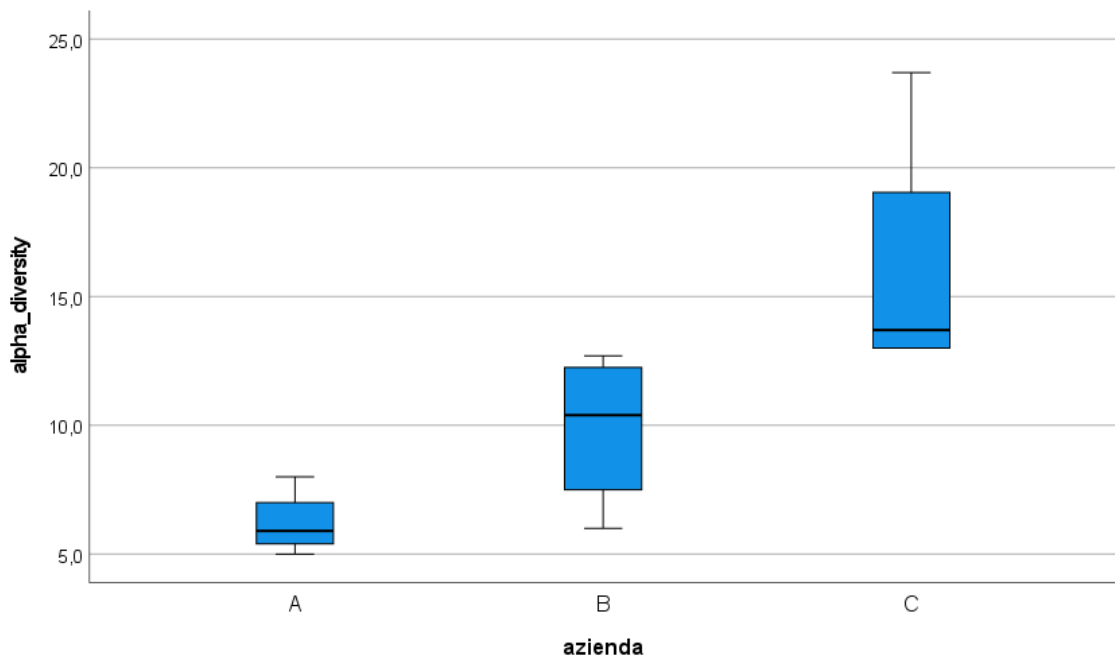


Figura 35. Boxplot relativo alle differenza tra le aziende dopo la fase di fine stagionatura.

In Figura 35 è possibile valutare il boxplot relativo alle diversità intercorrenti tra la tre aziende prese in esame, come si può facilmente osservare l'azienda che presenta una maggior variabilità interna e rispetto alle altre è l'azienda C, al contrario l'azienda A

mostra un'inter-variabilità molto ridotta. Queste valutazioni trovano riscontro anche nei dati ottenuti dalle abbondanze relative discussi di seguito.

I microrganismi dominanti in tutte le aziende sono *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus graminis* e *Leuconostoc carnosum* con abbondanze relative molto alte (66,34%), come si può facilmente vedere in Tabella 8 e Figura 36.

#OTU Table	A1	A1	A2	A2	B1	B1	B2	B2	C1	C1	C2	C2
	FST1	FST2	FST3	FST4	FST5	FST6	FST7	FST8	FST9	FST10	FST11	FST12
<i>Lactobacillus_algidus</i>	0,65	0	0	0	0	0	1,26	2,64	0,65	1,03	0,29	0,49
<i>Lactobacillus_sakei</i>	66,34	63,9	28,32	32,88	61	61,37	61,64	57,65	54,32	55,39	46,31	38,73
<i>Lactobacillus_graminis</i>	31,42	34,2	18,09	20,8	16,61	19,62	15,9	15,32	29,27	24,24	25,28	33,95
<i>Leuconostoc_carnosum</i>	0,42	1,35	52,93	45,61	16,7	13,22	16,43	17,84	10,61	13,02	16,24	14,39
<i>Leuconostoc_gasicomitatum</i>	0,3	0	0	0	0	0	0	0	0,44	0,21	0,14	0,15
<i>Lactobacillus_composti</i>	0	0	0,38	0,39	0,17	0	0,07	0,23	0,15	0,15	0	0
<i>Staphylococcus_xylosus</i>	0	0	0,26	0,13	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus_curvatus</i>	0	0	0	0,17	4,09	4,91	2,33	3,11	2,14	2,36	8,64	9,58
<i>Weissella_kandleri</i>	0	0	0	0	0,27	0	0,17	0,19	0	0,12	0,22	0,11
<i>Lactobacillus_malefermentans</i>	0	0	0	0	0,29	0	0	0,24	1,42	2,06	0,54	0,53
<i>Weissella_koreensis</i>	0	0	0	0	0,59	0,76	2,08	2,62	0,31	0,48	1,94	1,59
<i>Lactobacillus_delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0,23	0,11	0,18
<i>Streptococcus_thermophilus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,24	0,19	0	0
<i>Lactobacillus_sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0,14

Tabella 8. Tabella delle abbondanze relative percentuali delle specie batteriche identificate nella carne dopo la fase di stagionatura.

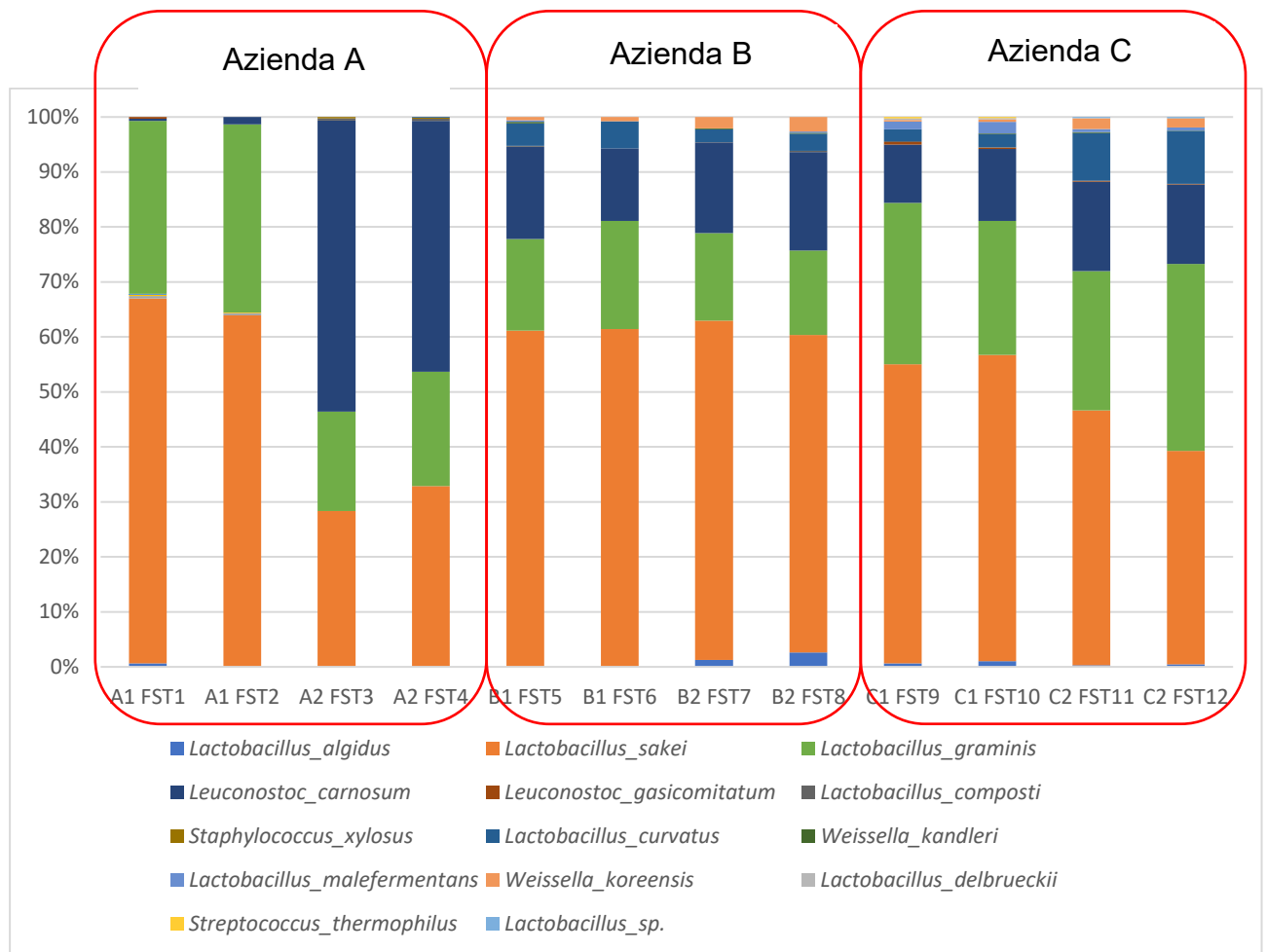


Figura 36. Grafico delle abbondanze relative percentuali in riferimento alle specie batteriche rilevate nella carne dopo la fase di stagionatura.

Oltre alle tre specie prevalenti in tutti i campioni, nell'azienda A si conferma l'assenza di altre specie presenti con abbondanze relative rilevanti; mentre nelle aziende B e C è risultata rilevante la presenza della specie *Latilactobacillus curvatus*, con un'abbondanza relativa massima di 9,58% nella replica 2 dell'azienda C. Altre specie, *Lb. algidus*, *Lb. malefermentans* e *W. koreensis* sono presenti con abbondanze relative piuttosto basse.

*S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii*, *W. kandleri* e *L. composti*, analogamente a quanto riscontrato nelle fasi precedenti, sono risultati presenti con abbondanze relative estremamente basse.

Andando a valutare le tre specie caratterizzanti il prodotto finito, si è visto che *Latilactobacillus sakei* è stato ampiamente studiato in relazione ai prodotti carnei, in primo luogo per le sue potenzialità come coltura starter grazie alla capacità di adattamento a diverse fonti nutritive, alla capacità di resistenza a vari stress, come le temperature di refrigerazione e le alte concentrazioni saline e alla capacità di

promuovere una rapida acidificazione (Zagorec & Champomier-Vergès, 2017). Inoltre, è un microrganismo che suscita molto interesse anche per quanto riguarda le sue proprietà antibatteriche, batteriostatiche e battericide nelle carni fermentate e nei prodotti a base di carne fresca; in particolare sono stati considerati e studiati gli aspetti che riguardano la produzione di batteriocine e l'azione bioprotettiva che si basa su queste ultime e sulla competitività che consentono la biopreservazione della carne fresca (Chaillou *et al.*, 2014). Sia le specie batteriche patogene, come *L. monocytogenes*, che quelle alteranti, come *B. thermosphacta*, sono bersaglio questa attività così da aumentare la sicurezza e la conservabilità dei prodotti carnei (Zagorec & Champomier-Vergès, 2017; Champomier-Vergès *et al.*, 2001).

Per la specie *Latilactobacillus graminis* sono stati riscontrati pochi dati in letteratura, alcuni studi confermano comunque la sua presenza all'interno delle colture utilizzate come starter in prodotti carnei fermentati (Raimondi *et al.*, 2018).

La terza specie preponderante è *Lauconostoc carnosum*, anche questo microrganismo è ampiamente studiato in relazione alla carne per la sua capacità inibitoria nei confronti di altri batteri dovuta alla produzione di acidi che determinano un abbassamento del pH, di perossido di idrogeno e di altre sostanze chimiche prodotte durante la crescita, comprese le batteriocine; queste ultime sono attive soprattutto nei confronti di batteri patogeni, come *L. monocytogenes*. Di rilievo anche il fatto che la produzione di sostanze antilisteriche non vada a modificare le proprietà organolettiche del prodotto (Budde *et al.*, 2003; Jacobsen *et al.*, 2003; Stiles, 1994).

#### **4.5 Valutazione dell'andamento del microbiota durante il processo produttivo**

Le tre aziende a partire da materia prima differente nel caso della ditta C, hanno svolto lo stesso processo produttivo, utilizzando la stessa ricetta in termini di spezie, quantità di conservanti e concentrazione di sale. Nonostante la diversa materia prima lavorata dall'Azienda C che si è tradotta in una diversa composizione del microbiota, il prodotto finito è risultato molto omogeneo tra tutti gli stabilimenti produttivi e caratterizzato dalle stesse specie microbiche predominanti: *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus graminis* e *Lauconostoc carnosum*.

Come è possibile vedere in Figura 37, che mette in relazione le variabili aziende e fasi di processo, le materie prime utilizzate sono tra loro molto differenti, ma dopo la fase di salagione la diversità diminuisce drasticamente e tende ad appiattirsi, questo perché le basse temperature e l'utilizzo del sale vanno a selezionare una flora microbica psicrotrofa e alotollerante. Questa viene favorita anche durante le fasi successive, in cui la temperatura si alza e il prodotto perde progressivamente parte del suo contenuto di acqua. Questo grafico, quindi, mette in evidenza la differenza tra materia prima e le altre fasi del processo produttivo in cui il microbiota tende a omogenizzarsi e caratterizzarsi in tutte le aziende, anche se l'elevata ricchezza in specie della materia prima dell'azienda C influenza in parte la composizione del microbiota anche del prodotto finito.

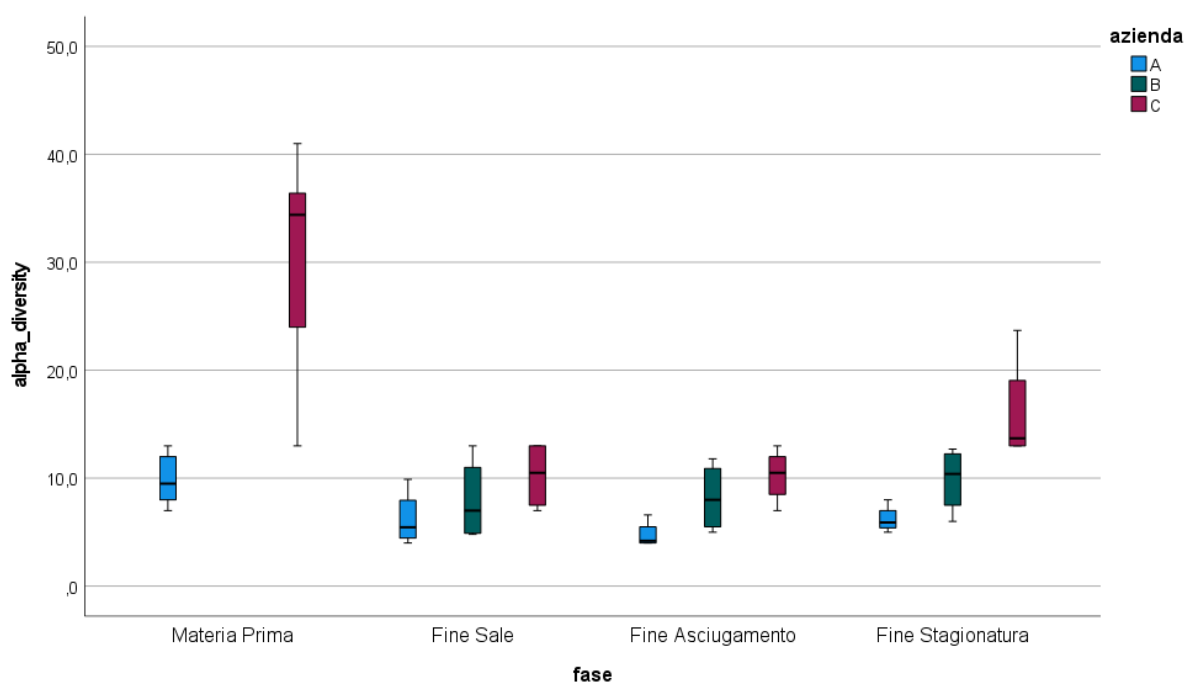


Figura 37. Boxplot relativo alla differenza tra aziende in relazione alla fase del processo produttivo.

Allo scopo di analizzare ulteriormente la diversità tra le varie fasi del processo produttivo è stato valutato l'indice di Beta-diversity mediante il software MicrobiomeAnalyst, un software online che consente l'analisi completa dei dati comunemente generati dagli studi sul microbioma. 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. La diversità tra campioni è stata, quindi, valutata attraverso la

creazione di un *plot* denominato *2D PCoA Plot (Principal Coordinates Analysis)*, nel quale 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.

La Figura 38 rappresenta la distanza (diversità) genetica tra le *OTUs* dei 4 gruppi (MP, FS, FA e FST). 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 nell'indice di Bray-Curtis, che pesa in maniera differente i taxa meno abbondanti e quelli più abbondanti. 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.

In Figura 38 le coordinate utilizzate sono rappresentate dall'asse 1 e 2 e spiegano rispettivamente il 50,5% e il 20,1% della variabilità. Dalla figura si può osservare come i quattro gruppi risultino essere tutti sovrapposti in una specifica area, inoltre è possibile notare come la materia prima risulti essere rappresentata da un'ellisse molto più ampia di quella delle altre fasi. L'ellissi corrispondente alla fine salagione presenta invece un'area più ridotta e questo è dovuto alla selezione di un microbiota psicrotrofo e alotollerante; infine le fasi di fine asciugamento e fine stagionatura presentano ellissi quasi completamente sovrapposte e di molto ridotte rispetto alle precedenti, questo a sottolineare la caratterizzazione delle specie batteriche tipiche del prodotto finito.

L'elevata compattezza dei campioni di queste ultime due fasi indica una minore inter-variabilità tra i campioni, al contrario i campioni della materia prima presentano un'inter-variabilità estremamente elevata.

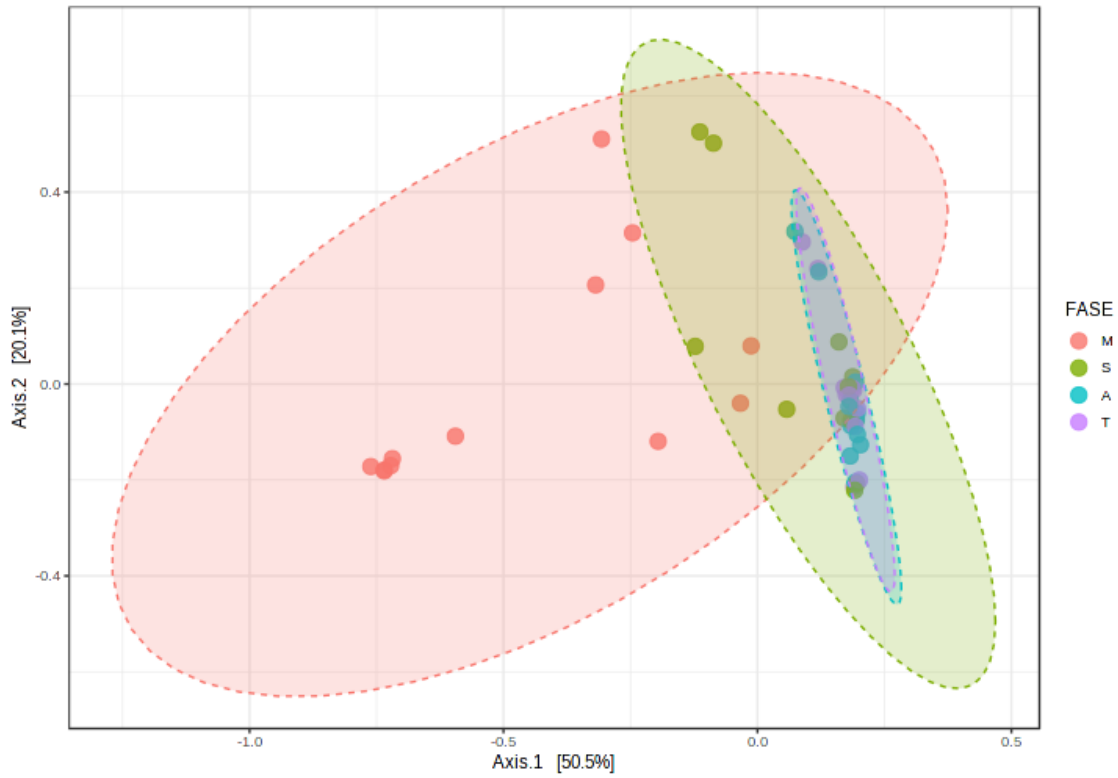


Figura 38. PCoA dei campioni suddivisi nelle diverse fasi del processo produttivo (MP, FS, FA e FST) utilizzando l'indice Bray-Curtis; p-value: 0.001.

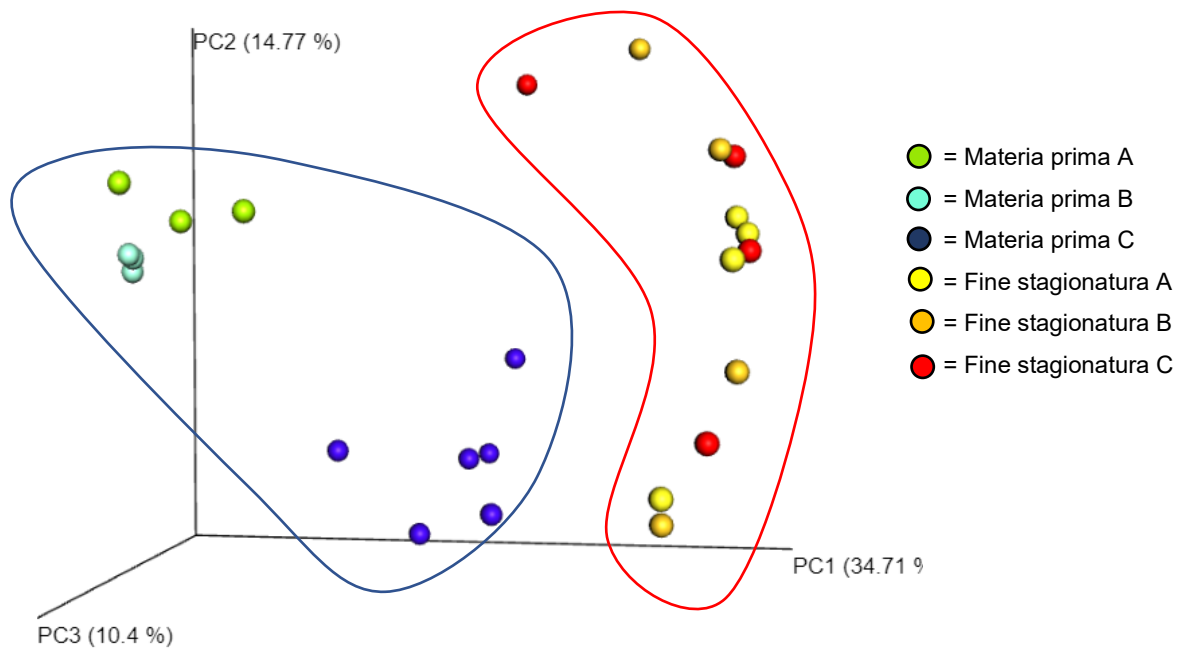


Figura 39. Grafico relativo alla differenza tra campione della materia prima e campioni di fine stagionatura.

In ultima istanza è stata posta l'attenzione sul confronto tra la fase iniziale e quella finale del processo produttivo, sono infatti stati inseriti i dati relativi ai campioni di materia prima e di fine stagionatura allo scopo di ottenere un grafico PCoA che evidenziasse ulteriormente la differenza in termini di composizione microbica tra carne fresca e bresaola stagionata (Figura 39).



## **5 CONCLUSIONI**

La bresaola è il risultato della combinazione di una serie di fattori ambientali, di produzione e di lavorazione, tali fattori possono influenzare in modo variabile il microbiota tipico. Risulta quindi fondamentale rispettare le indicazioni fornite dal Disciplinare di produzione e lavorare in modo ottimale in tutte le fasi del processo produttivo.

Alla luce di ciò si è impostato il presente lavoro di tesi con l'obiettivo di caratterizzare le comunità microbiche normalmente residenti a livello superficiale della bresaola. Il presente studio ha preso in esame 48 campioni, derivati da 12 bresaole provenienti da 3 diversi stabilimenti produttivi campionati in quattro fasi del processo produttivo. Sui 48 campioni è stata realizzata un'analisi molecolare di tipo coltura-indipendente tramite sequenziamento NGS per mezzo della piattaforma *Ion S5* di *Ion Torrent* che ha permesso di identificare i generi e le specie presenti nei campioni in analisi.

Nella trattazione dei dati ottenuti, si è potuta sottolineare l'accuratezza e l'entità dei dati ricavati per mezzo della tecnologia impiegata. I generi e le specie riscontrati erano suddivisi in modo estremamente variabile in relazione alle diverse fasi di processo e allo stabilimento di provenienza; è stata messa in evidenza la ricchezza di specie rilevate nella materia prima, in particolare di una delle aziende prese in esame, e come poi questa si sia andata a ridurre e caratterizzare sempre di più durante il processo produttivo in tutte le aziende. In particolare è stato osservato che, la selezione di un microbiota tipico composto prevalentemente da batteri lattici, inizia dalle prime fasi del processo, in cui l'azione del sale e le basse temperature favoriscono lo sviluppo di batteri psicrotrofi e alotolleranti a scapito di enterobatteri e altre specie alteranti. Nel corso dell'asciugamento e della stagionatura i batteri lattici raggiungono il massimo della concentrazione; con il passaggio alle "fasi calde" infatti, la composizione del microbiota va affermandosi e si raggiunge un'omogeneità in tutte le aziende. Le specie microbiche predominanti, presenti in tutti i campioni di tutte le aziende sono risultate appartenere alle specie *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus graminis* e *Lauconostoc carnosum*.

Come riportato da diversi lavori in bibliografia e discusso nelle sezioni precedenti, i microrganismi svolgono spesso un ruolo importante nello sviluppo degli aromi, dei sapori, del colore e nella garanzia della sicurezza di un prodotto a base di carne cruda, come la bresaola. Ampliare le conoscenze relative alla composizione del microbiota

risulta pertanto il primo passo fondamentale per capire le dinamiche che concorrono alla formazione delle caratteristiche organolettiche tipiche della bresaola. In tal senso, la tecnica molecolare *Next Generation Sequencing* si è rivelata uno strumento di particolare utilità dal momento che consente di identificare con grande accuratezza i microrganismi presenti in un campione, mettendo in luce anche la presenza di quelli difficilmente identificabili con i metodi culturali tradizionali coltura-dipendenti. I metodi microbiologici tradizionali, basati su tecniche di coltura, isolamento e identificazione biochimica sono stati da sempre impiegati per lo studio degli andamenti delle popolazioni batteriche nei prodotti alimentari; presenta però il limite di non riuscire ad individuare anche i microrganismi che si trovano in stato sub letale o i microrganismi non facilmente coltivabili.

## **6 BIBLIOGRAFIA**

- Abee, T., Krockel, L., & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 169–185. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00055-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00055-0)
- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, pipelines, parameters: issues in 16S rRNA gene sequencing. *Mosphere*, 6(1), 10–1128.
- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology*, 186(9), 2629–2635.
- Adams, M. R. (1998). The Microbiology of Meat and Poultry. *International Journal of Food Science and Technology*, 33(2), 193–194. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.33201912.x>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555.
- Ballarini, G. (1997). *Il nome della bresaola e dei ruminanti preistorici*. 1–6.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2016). *The microbiological quality of food: foodborne spoilers*. Woodhead Publishing.
- Björkroth, K. J., Vandamme, P., & Korkeala, H. J. (1998). Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3313–3319. <https://doi.org/10.1128/aem.64.9.3313-3319.1998>
- Borch, E., Kant-Muemansb, M.-L., & Blixt, Y. (1996). Bacterial spoilage of meat products and cured meat. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 33).
- Budde, B. B., Hornbæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., & Koch, A. G. (2003). *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: Culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*, 83(2), 171–184. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00364-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00364-1)
- Busconi, M., Zacconi, C., & Scolari, G. (2014). Bacterial ecology of PDO Coppa and Pancetta Piacentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.023>

- CANTONI, C., CATTANEO, P., & BERSANI, C. (1992). Alterazioni di colore dell bresaola. *Industrie Alimentari (Pinerolo)*, 31(303), 314–317.
- Cantoni, C., & Marzano, M. A. (2007). Caratteristiche organolettiche, nutrizionali e tecniche di produzione delle carni bovine salate. *EUROCARNI*, 22(4), 113–124.
- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1829.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483–499.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.009>
- Castellano, P., González, C., Carduza, F., & Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science*, 85(3), 394–401.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.02.007>
- Cattaneo, P., & Cantoni, C. (2005). Use of nitrate and nitrites in cured meat technology. *Ingegneria Alimentare. Le Carni (Italy)*, 2(6).
- Cauchie, E., Delhalle, L., Taminiau, B., Tahiri, A., Korsak, N., Burteau, S., Fall, P. A., Farnir, F., Baré, G., & Daube, G. (2020). Assessment of Spoilage Bacterial Communities in Food Wrap and Modified Atmospheres-Packed Minced Pork Meat Samples by 16S rDNA Metagenetic Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03074>
- Cebrián, E., Roncero, E., Delgado, J., Núñez, F., & Rodríguez, M. (2023). Deciphering *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* mode of action against *Penicillium nordicum* in a dry-cured ham model system. *International Journal of Food Microbiology*, 405(July).  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110342>
- Chaillou, S., Christieans, S., Rivollier, M., Lucquin, I., Champomier-Vergès, M. C., & Zagorec, M. (2014). Quantification and efficiency of *Lactobacillus sakei* strain mixtures used as protective cultures in ground beef. *Meat Science*, 97(3), 332–338. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.009>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic

- bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330–339.
- Champomier-Vergès, M. C., Chaillou, S., Cornet, M., & Zagorec, M. (2001). Lactobacillus sakei: Recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*, 152(10), 839–848. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01267-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01267-0)
- Chen, S., Liu, S., Ma, J., Xu, X., & Wang, H. (2022). Evaluation of the spoilage heterogeneity of meat-borne Leuconostoc mesenteroides by metabonomics and in-situ analysis. *Food Research International*, 156(May), 111365. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111365>
- Chidgeavadze, Z. G., Beabealashvili, R. S., Atrazhev, A. M., Kukhanova, M. K., Azhaye, A. V., & Krayevsky, A. A. (1984). 2', 3'-Dideoxy-3'aminonucleoside 5'-triphosphates are the terminators of DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 12(3), 1671.
- Comi, G., Andyanto, D., Manzano, M., & Iacumin, L. (2016). Lactococcus lactis and Lactobacillus sakei as bio-protective culture to eliminate Leuconostoc mesenteroides spoilage and improve the shelf life and sensorial characteristics of commercial cooked bacon. *Food Microbiology*, 58, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.001>
- Conrads, G., Claros, M. C., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., Merriam, V., & Goldstein, E. J. C. (2002). 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus Fusobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 493–499.
- Cordero, M. R., & Zumalacárregui, J. M. (2000). Characterization of Micrococcaceae isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 31(4), 303–306. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2000.00818.x>
- de W Blackburn, C. (2006). *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing.
- Di Gioia, D., Mazzola, G., Nikodinoska, I., Aloisio, I., Langerholc, T., Rossi, M., Raimondi, S., Melero, B., & Rovira, J. (2016). Lactic acid bacteria as protective cultures in fermented pork meat to prevent Clostridium spp. growth. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.019>
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J.-P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental

- and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623–3630.
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2003). Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8817–8822.
- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., & Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*, 34(3).  
<https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>
- FINAZZI, G., DAMINELLI, P., MONASTERO, P., BONI, P., COSCIANICUNICO, E., & AGLIETTA, A. (2008). COMPORTAMENTO DI MICRORGANISMI PATOGENI IN BRESAOLA DELLA VALTELLINA IGP ARTIFICIALMENTE CONTAMINATA. *Industrie Alimentari*, 47(477), 148–151.
- Giello, M., La Storia, A., Masucci, F., Di Francia, A., Ercolini, D., & Villani, F. (2017). Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. *Food Microbiology*, 63, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.016>
- Gray, W. M., & Johnson, M. G. (1976). Characteristics of bacteria isolated by the anaerobic roll tube method from cheeses and ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2), 268–273.  
<https://doi.org/10.1128/aem.31.2.268-273.1976>
- Griglio, B., Testa, A., Piovesan, F., & Civera, T. (2011). *Alterazioni Organolettiche Negli Alimenti Causate Da Pseudomonadaceae E Possibili Ricadute Per La Sanita* . 1–10.
- Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35, 1–21.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8.
- Hernández-Aquino, S., de Jesús Maldonado Simán, E., Miranda-Romero, L. A., & Zuñiga, B. A. (2020). Meat native lactic acid bacteria capable to inhibit salmonella sp. And Escherichia coli. *Biocontrol Science*, 25(2), 107–112.



<https://doi.org/10.4265/BIO.25.107>

- Hortensia Silla Santos, M. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 227–230. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00129-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00129-3)
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4765–4774.
- Jacobsen, T., Budde, B. B., & Koch, A. G. (2003). Application of *Leuconostoc carnosum* for biopreservation of cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 242–249. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01970.x>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
- Janßen, D., Eisenbach, L., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2018). Assertiveness of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* in a fermented sausage model. *International Journal of Food Microbiology*, 285(October 2017), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.030>
- Jeong, D., Kim, D. H., Kang, I. B., Chon, J. W., Kim, H., Om, A. S., Lee, J. Y., Moon, J. S., Oh, D. H., & Seo, K. H. (2017). Prevalence and toxin type of *Clostridium perfringens* in beef from four different types of meat markets in Seoul, Korea. *Food Science and Biotechnology*, 26(2), 545–548. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0075-5>
- Jiang, H., Qin, Y. M., Yang, X. T., Li, Q. L., Shen, Q. C., Ding, J. B., Wei, R. Y., Zhang, J. D., Sun, J. L., Sun, M. J., & Fan, X. Z. (2021). Bacteriological and molecular typing of *clostridium perfringens* strains isolated in retail beef in Beijing, China. *Journal of Veterinary Medical Science*, 83(10), 1593–1596. <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0129>
- Kang, S., Ravensdale, J. T., Coorey, R., Dykes, G. A., & Barlow, R. S. (2020). Bacterial community analysis using 16S rRNA amplicon sequencing in the boning room of Australian beef export abattoirs. *International Journal of Food Microbiology*, 332(July), 108779. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108779>

- Kröckel, L. (2013). The role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products. *Lactic Acid Bacteria—R & D for Food, Health and Livestock Purposes; Kongo, JM, Ed*, 129–151.
- Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., & Leisner, J. J. (2005). Carnobacterium divergens and Carnobacterium maltaromaticum as spoilers or protective cultures in meat and seafood: Phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(2), 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.001>
- Leisner, J. J., Greer, G. G., Dilts, B. D., & Stiles, M. E. (1995). Effect of growth of selected lactic acid bacteria on storage life of beef stored under vacuum and in air. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 231–243.
- Leroi, F., Fall, P. A., Pilet, M. F., Chevalier, F., & Baron, R. (2012). Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of Brochothrix thermosphacta and a bioprotective bacteria Lactococcus piscium CNCM I-4031. *Food Microbiology*, 31(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.014>
- Leroy, F., Lievens, K., & De Vuyst, L. (2005). Interactions of meat-associated bacteriocin-producing lactobacilli with Listeria innocua under stringent sausage fermentation conditions. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2078–2084. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2078>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, X., Liu, Z., Cheng, Y., Wu, H., Shen, W., Liu, Y., Feng, Q., & Yang, J. (2021). Application of Next-Generation Sequencing Technology Based on Single Gene Locus in Species Identification of Mixed Meat Products. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4512536>
- Lücke, F.-K. (1994). Fermented meat products. *Food Research International*, 27(3), 299–307.
- Macheak, M. E. (1978). Clostridial diseases of cattle. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician : VM, SAC*, 73(2), 195–200.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., & Chen, Z. (2005). Genome

- sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380.
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-generation sequencing technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(11).
- Membre, J. M., & Burlot, P. M. (1994). Effects of temperature, pH, and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2017–2022.  
<https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2017-2022.1994>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31–46.
- Mora, D., Ricci, G., Guglielmetti, S., Daffonchio, D., & Fortina, M. G. (2003). 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology*, 149(3), 807–813.
- Nieminen, T. T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., Solismaa, M., & Björkroth, K. J. (2011). Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.018>
- Nørrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 78(1–2), 14–24.
- Nortjé, G. L., & Naudé, R. T. (1981). Microbiology of Beef Carcass Surfaces. *Journal of Food Protection*, 44(5), 355–358. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-44.5.355>
- Nowak, A., & Piotrowska, M. (2012). Biochemical activities of *Brochothrix thermosphacta*. *Meat Science*, 90(2), 410–413.
- Nyrén, P., & Lundin, A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 504–509.
- Paleari, M. A., Bersani, C., Vittorio, M. M., & Beretta, G. (n.d.). *Effect of curing and fermentation on the microflora of meat of various animal species*.  
[www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)
- Patel, J. B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6, 313–321.
- Peruzy, M. F., Murru, N., Yu, Z., Cnockaert, M., Joossens, M., Proroga, Y. T. R., &

- Houf, K. (2019). Determination of the microbiological contamination in minced pork by culture dependent and 16S amplicon sequencing analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 290(June 2018), 27–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.025>
- PIETRA, L. L., Pirone, G., & Longo, M. (1998). IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MICROCOCCACEAE ISOLATE DA CAPOCOLLO. INSACCATO TIPICO DELLA CAMPANIA. *Industria Conserve*, 73(3), 239–241.
- Pořka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L., & Puglisi, E. (2015). Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiology*, 46, 342–356. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.023>
- Raimondi, S., Nappi, M. R., Sirangelo, T. M., Leonardi, A., Amaretti, A., Ulrici, A., Magnani, R., Montanari, C., Tabanelli, G., Gardini, F., & Rossi, M. (2018). Bacterial community of industrial raw sausage packaged in modified atmosphere throughout the shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, 280(April), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.041>
- Rebecchi, A., Lucchini, F., Cappa, F., Crivori, S., & Sarra, P. G. (1998). Indagine sulle Micrococcaceae della coppa piacentina. *Industria Conserve*, 73(2), 131–134.
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M.-F., & Zagorec, M. (2015). Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 45, 45–53.
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. P. (2015). High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*, 58(4), 586–597.
- Robinson, R. K., & Batt, C. A. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier Science. <https://books.google.it/books?id=1b1CAgAAQBAJ>
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., & Edwards, M. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348–352.
- Såde, E. (2011). *Leuconostoc spoilage of refrigerated, packaged foods*.
- Såde, E., Johansson, P., Heinonen, T., Hultman, J., & Björkroth, J. (2020). Growth and metabolic characteristics of fastidious meat-derived *Lactobacillus algidus*

- strains. *International Journal of Food Microbiology*, 313(June 2019), 108379.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108379>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.
- Saraoui, T., Leroi, F., Björkroth, J., & Pilet, M. F. (2016). *Lactococcus piscium*: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 907–918.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13179>
- Schirmer, B. C., Heir, E., & Langsrud, S. (2009). Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2106–2116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04183.x>
- Senne, M. M., & Gilliland, S. E. (2003). Antagonistic action of cells of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* against pathogenic and spoilage microorganisms in fresh meat systems. *Journal of Food Protection*, 66(3), 418–425.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.3.418>
- Shaw\* A N D, B. G., & Harding, C. D. (1989). *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from Chill-Stored Meats. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*.
- Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Carvalho, M. da G. S., Elliot, J. A., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M., & Facklam, R. R. (2004). *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1505–1510.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02908-0>
- Sikes, A., & Rolle, G. E. (1987). Effect of a Methanol-Acetone Extract of Skim Milk Fermented by *Streptococcus thermophilus* on Color, Microbial Counts, and pH of Fresh Beef. *Journal of Food Protection*, 50(2), 127–131.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-50.2.127>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of next generation sequencing technologies (and bioinformatics) in cancer. *Molecular Biology*, 122(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59.Overview>
- Stager, C. E., & Davis, J. R. (1992). Automated systems for identification of microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(3), 302–327.

- Stavropoulou, D. A., De Maere, H., Berardo, A., Janssens, B., Filippou, P., De Vuyst, L., De Smet, S., & Leroy, F. (2018). Pervasiveness of *Staphylococcus carnosus* over *Staphylococcus xylosus* is affected by the level of acidification within a conventional meat starter culture set-up. *International Journal of Food Microbiology*, 274(March), 60–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.006>
- Stiles, M. E. (1994). Bacteriocins Produced by *Leuconostoc* Species. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2718–2724. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77214-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77214-3)
- Tesson, V., Federighi, M., Cummins, E., Mota, J. de O., Guillou, S., & Boué, G. (2020). A systematic review of beef meat quantitative microbial risk assessment models. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030688>
- Toldrá, F. (2022). *Lawrie's meat science*. Woodhead Publishing.
- United States Department of Agriculture. (2005). *Meat and Poultry Hazards and Controls Guide Food Safety and Inspection Service United States Department of Agriculture*. September, 1–35.
- van Reckem, E., Champi, C., van der Veken, D., Borremans, W., de Vuyst, L., Weckx, S., & Leroy, F. (2020). Application of a high-throughput amplicon sequencing method to chart the bacterial communities that are associated with european fermented meats from different origins. *Foods*, 9(9).  
<https://doi.org/10.3390/foods9091247>
- Van Reckem, E., Claeys, E., Champi, C., Sosa Fajardo, A., Van der Veken, D., Maes, D., Weckx, S., De Vuyst, L., & Leroy, F. (2021). High-throughput amplicon sequencing to assess the impact of processing factors on the development of microbial communities during spontaneous meat fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 354(June).  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109322>
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., & Holt, R. A. (2001). The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507), 1304–1351.
- Vihavainen, E. J., & Björkroth, K. J. (2007). Spoilage of value-added, high-oxygen modified-atmosphere packaged raw beef steaks by *Leuconostoc gasicomitatum* and *Leuconostoc gelidum*. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3),

- 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.029>
- Voelkerding, K. V., Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 641–658.
- Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS One*, *4*(10), e7401.
- Watson, S. C., Furbeck, R. A., Fernando, S. C., Chaves, B. D., & Sullivan, G. A. (2023). Spoilage *Pseudomonas* survive common thermal processing schedules and grow in emulsified meat during extended vacuum storage. *Journal of Food Science*, *88*(5), 2162–2167. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16557>
- Watts, G. S., Youens-Clark, K., Slepian, M. J., Wolk, D. M., Oshiro, M. M., Metzger, G. S., Dhingra, D., Cranmer, L. D., & Hurwitz, B. L. (2017). 16S rRNA gene sequencing on a benchtop sequencer: accuracy for identification of clinically important bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(6), 1584–1596.
- Wickramasinghe, N. N., Ravensdale, J., Coorey, R., Dykes, G. A., & Chandry, P. S. (2021). Transcriptional profiling of biofilms formed on chilled beef by psychrotrophic meat spoilage bacterium, *Pseudomonas fragi* 1793. *Biofilm*, *3*(October 2020), 100045. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2021.100045>
- Zagorec, M., & Champomier-Vergès, M. C. (2017). *Lactobacillus sakei*: A starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. *Microorganisms*, *5*(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030056>
- Zambonelli, C. (1992). *Microbiologia dei salumi*. Edagricole-New Business Media. <https://books.google.it/books?id=OnIMAAAACAAJ>
- Zhang, Y., Zhu, L., Dong, P., Liang, R., Mao, Y., Qiu, S., & Luo, X. (2018). Bio-protective potential of lactic acid bacteria: Effect of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* on changes of the microbial community in vacuum-packaged chilled beef. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *31*(4), 585–594. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0540>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

Zhou, X., Ren, L., Meng, Q., Li, Y., Yu, Y., & Yu, J. (2010). The next-generation sequencing technology and application. *Protein & Cell*, 1(6), 520–536.

## **SITOGRAFIA**

<http://www.bresaoladellavaltellina.it>

<https://www.politicheagricole.gov.it>

<https://www.treccani.it>

<https://www.fsis.usda.gov>

<https://www.pmp.erc.ars.usda.gov>

## **REGOLAMENTI e NORMATIVE**

**Discipinare di Produzione della Indicazione Geografica Protetta “Bresaola della Valtellina”**. Decreto 23 dicembre 1998 – GURI n.5 dell’8 gennaio 1999

**REGOLAMENTO (CE) 14 Luglio 1992, n. 2081** sulla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine.

**REGOLAMENTO (CE) 1 Luglio 1996, n. 1263** che completa l'allegato del regolamento (CE) n. 1107/96 relativo alla registrazione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine nel quadro della procedura di cui all'articolo 17 del regolamento (CEE) n. 2081/92 .



## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare la professoressa Barbara Cardazzo, relatore di questa tesi, per la disponibilità e gentilezza dimostratami in questi mesi.

Un sentito ringraziamento va alla Dott.ssa Mutti che mi ha dato la possibilità di svolgere il mio tirocinio presso la SSICA, in questi mesi la fortuna di lavorare in un ambiente interessante, dinamico, professionale e al tempo stesso accogliente, che mi ha permesso di mettermi in gioco e fare un'esperienza che sarà preziosa per il mio futuro.

Ringrazio la mia correlatrice Dott.ssa Maria Angela Frustoli per tutti gli insegnamenti datimi in questi mesi, ma soprattutto per la competenza, la professionalità e la disponibilità con cui mi hai guidata durante il mio tirocinio formativo e per il supporto fondamentale nella stesura della tesi, sei stata un punto di riferimento fondamentale.

Grazie anche a tutto il personale del Dipartimento di microbiologia per la perenne gentilezza e disponibilità nel prestare aiuto in qualunque momento; vorrei ringraziare in particolare il Dott. Massimo Cigarini e la Dott.ssa Maria Silvia Grisenti, per avermi da subito accolta e messa a mio agio.

Vogli ringraziare anche Ilaria, Asia, Angela e Serena che, in momenti e modi diversi, mi sono state vicine e mi hanno aiutata in questi mesi.

Ringrazio infine tutta la mia famiglia e Pier per aver sempre creduto in me, per avermi sostenuta e per condividere con me la gioia e la soddisfazione per questo traguardo.