

Ruolo della microbiologia nei settori agro-alimentare ed ambientale

17 – 18 luglio 2006

Bologna

Comitato Organizzatore:

Bruno Biavati (Presidente)

Francesca Clementi

Roberto De Philippis

Antonio Farris

Patrizia Romano

Claudia Sorlini

Giovanna Suzzi

Programma e Abstracts

INDICE:

Programma	Pag.	3
Presentazioni orali	Pag.	7
Poster	Pag.	29
Indice degli autori	Pag.	107

Ruolo della microbiologia nei settori agro-alimentare ed ambientale

PROGRAMMA

PROGRAMMA

Ruolo della microbiologia nei settori agro-alimentare ed ambientale

Bologna, 17-18 Luglio 2006
Aula Magna Facoltà di Agraria – v.le Fanin 44

Lunedì 17 Luglio 2006

- ore 9.00: Arrivo ed Iscrizione dei partecipanti
- ore 10.00: Saluti del Preside – Andrea Segré – Facoltà di Agraria, Università di Bologna

Sessione I – Relazioni

Moderatori: Bruno Biavati (Università di Bologna), Claudia Sorlini (Università di Milano)

- ore 10.30: “Prospettive della microbiologia nell’innovazione di prodotto e di processo per l’industria alimentare” – Elisabetta Guerzoni – Università di Bologna
- ore 11.10: “Industria alimentare ed Università: una simbiosi auspicata nel VII Programma Quadro UE” – Daniele Rossi – Direttore Federalimentare
- ore 11.50: “Strategie ambientali della regione Emilia-Romagna e la domanda di ricerca” – Giuseppe Bortone – Assessorato ambiente e sviluppo sostenibile regione Emilia-Romagna
- ore 12.30: “Microrganismi e ambiente” – Marco De Bertoldi – Università di Udine
- ore 13.10: Pranzo
- ore 14.00-15.30: Visione Poster

Sessione II – Comunicazioni

Moderatori: Antonio Farris (Università di Sassari), Giovanna Suzzi (Università di Teramo)

- ore 15.30: Studio della biodiversità di microrganismi associati ai processi fermentativi: il caso di *Saccharomyces cerevisiae*
I. Mannazzu, M. Ciani, L. Aquilanti, F. Clementi
- ore 15:50: Lattobacilli del “lievito naturale” e patologia celiaca
R. Di Cagno, M. De Angelis, C.G. Rizzello, F. Minervini, M. Gobbetti
- ore 16:10: Tolleranza agli stress abiotici in lattobacilli geneticamente modificati
D. Fiocco, A. Vernile, S. Massa, G. Spano
- ore 16:30: Presenza e caratterizzazione genica dell’enzima glutammatodeidrogenasi in *Streptococcus thermophilus*

- C. Lazzi, V. Bernini, M. Ventura, M. Gatti, J. De Dea Lindner, E. Neviani
ore 16:50: Analisi RAPD-PCR per valutare l'influenza dell'habitat sul polimorfismo genetico in lieviti di origine alimentare
- A. Capece, V. Serafino, J. Arizon, P. Romano
ore 17:10: Correlazione fra biosintesi di mannoproteine e comportamento fermentativo in ceppi vinari di *Saccharomyces cerevisiae*
- G. Zara, M. Budroni, G.A. Farris, S. Zara, H.J.J van Vuuren
ore 17.30: Pausa caffè
- ore 18.00: Assemblea ordinaria SIMTREA
- ore 20.00: Conclusione lavori Assemblea
- ore 21.00: Cena sociale

Martedì 18 Luglio 2006

Sessione III – Comunicazioni

Moderatori: Francesca Clementi (Università Politecnica delle Marche), Roberto De Philippis (Università di Firenze)

- ore 9.00: Aspetti microbiologici e biosoppressibilità in residui agro-industriali compostati
G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, G. Ranalli
- ore 9.20: Potenziali applicazioni dei cianobatteri bioattivi
N. Biondi, L. Rodolfi, M.R. Tredici
- ore 9.40: Biodiversità microbica , ecofisiologia e biotecnologia in laghi sottomarini ipersalini anossici del Mediterraneo orientale
D. Daffonchio, S. Borin, T. Brusa, L. Brusetti
- ore 10.00: Quantificazione delle distanze di comunicazione intercellulare Quorum Sensing mediante analisi di immagine in microscopia a fluorescenza
E. Polone, F.B. Dazzo, M. Basaglia, S. Casella, A. Squartini
- ore 10.20: Composizione e attività potenziale della comunità di batteri ammonio-ossidanti in una *constructed wetland* per la depurazione di reflui caseari
R. Gorra, M. Coci, R. Ambrosoli, H.J. Laanbroek
- ore 10.40: Ruolo dei microrganismi nel ciclo biogeochimico dell'arsenico e loro possibile utilizzo per la detossificazione di siti contaminati
E. Bellina, M. De Bertoldi, M. Civilini
- ore 11.00: Indicatori microbici di "effetto priming" in suoli agrari gestiti con pratiche di sovescio
E. Di Mattia, F. Canganella
- ore 11.20: Pausa caffè

Sessione IV – Comunicazioni

Moderatori: Bruno Biavati (Università di Bologna), Patrizia Romano (Università della Basilicata)

- ore 11.50: Verifica della colonizzazione di *Bifidobacterium* spp. ed effetto di prebiotici nella dieta di suini in svezzamento
M. Modesto, M.R. D'Aimmo, I. Stefanini, M. Mazzoni, P. Travisi, C. Tittarelli, P. Bosi, B. Biavati
- ore 12.10: Influenza di batteri alofili estremi nella lavorazione tradizionale di alici salate
M. Aponte, M. Chiurazzi, V. Ventorino, A. Casaburi, R. Sacchi, G. Moschetti
- ore 12.30: Applicazioni dell'analisi metabolomica mediante FTIR (Fourier Transform Infra Red Spectroscopy) nell'identificazione e dereplicazione microbica
P. Rellini, L. Corte, F. Faticenti, G. Cardinali.
- ore 12.50: Effetti combinati di lattoferricina B e alte pressioni sull'inattivazione di *Escherichia coli* ATCC 43888
G. Scolari, M. Bonatti, M. Vescovo, C. Zacconi
- ore 13.10: Potenziale batteriocinogenico di batteri lattici isolati da grani, farine e impasti acidi
L. Settanni, G. Suzzi, A. Corsetti
- ore 13.30: Applicazione della tecnologia DNA-Microarray per la caratterizzazione tassonomica e funzionale dei batteri lattici
A. Castioni A., F. Fianchetti, G.E. Felis, K. Zanini, F. Rossi, S. Torriani
- ore 13.50: Molecole del quorum sensing prodotte da batteri endofiti: quale ruolo rivestono?
M. del Gallo, C. Ercole, P. Cacchio, M. Federle e B. Bassler
- ore 14.10: Conclusioni convegno

Ruolo della microbiologia nei settori agro-alimentare ed ambientale

PRESENTAZIONI ORALI

STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DI MICRORGANISMI ASSOCIATI AI PROCESSI FERMENTATIVI: IL CASO DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

I. Mannazzu, M. Ciani, L. Aquilanti, F. Clementi

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche,
Via Brecce Bianche, 60131, Ancona

Lo studio della biodiversità di microrganismi associati ai processi fermentativi è di grande rilievo nel settore alimentare. Infatti, fornisce indicazioni sulla complessità delle comunità microbiche e quindi su specie e ceppi che intervengono in contemporanea o in successione nel corso dei processi fermentativi, permette di valutare il contributo di microrganismi diversi al processo fermentativo e di rilevare la presenza di contaminanti nelle matrici di interesse. Inoltre, lo studio e la conservazione della biodiversità consentono di preservare specie e *pool* di geni di primaria importanza per l'implementazione di processi produttivi basati sull'impiego di microrganismi.

Attualmente nei nostri laboratori sono utilizzati numerosi metodi molecolari in grado di analizzare la composizione delle comunità microbiche, in particolare di batteri lattici e lieviti. Uno di questi, che consente di biotipizzare i lieviti appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*, è stato messo a punto nel nostro laboratorio e impiegato per studiare la biodiversità di lieviti vinari isolati da uve e mosti e valutare la dominanza di starter inoculati nel corso di fermentazioni industriali.

Il procedimento logico impiegato per la messa a punto del metodo è scaturito da osservazioni riguardanti la presenza di minisatelliti all'interno della ORF di geni codificanti proteine di superficie di *S. cerevisiae*. Considerato che la presenza di minisatelliti può causare polimorfismo di lunghezza, per effetto del potenziale ricombinogenico delle sequenze ripetute, abbiamo ipotizzato che geni contenenti minisatelliti potessero costituire una fonte di variabilità genetica inesplorata e impiegabile per la caratterizzazione molecolare dei lieviti vinari. Inizialmente tale assunto è stato confermato da nostre osservazioni riguardanti il polimorfismo di lunghezza del gene *SEDI* in una popolazione di *S. cerevisiae* selvatici. Successivamente, per verificare l'ipotesi di partenza su un pool più ampio di geni abbiamo scansionato il genoma di *S. cerevisiae* e selezionato le sequenze di geni contenenti minisatelliti e codificanti proteine di superficie. Abbiamo quindi proceduto con la individuazione di bersagli molecolari potenzialmente polimorfici sulla base della percentuale di identità tra sequenze ripetute e della loro lunghezza. Inoltre, dato che variazioni di lunghezza possono rappresentare un deficit nel funzionamento di proteine a funzione enzimatica e quindi uno svantaggio selettivo per alleli di taglia diversa, abbiamo focalizzato l'attenzione su geni codificanti proteine a funzione strutturale e selezionato tre geni con le caratteristiche richieste. Questi geni, analizzati mediante PCR in una vasta popolazione di lieviti vinari, hanno mostrato un marcato polimorfismo di lunghezza e consentito una chiara discriminazione tra ceppi diversi nell'ambito della specie di interesse. Assieme al gene *SEDI* essi rappresentano bersagli molecolari preferenziali per la biotipizzazione e lo studio della biodiversità dei lieviti ascritti alla specie *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae, biodiversità, minisatelliti

LATTOBACILLI DEL “LIEVITO NATURALE” E PATOLOGIA CELIACA

R. Di Cagno, M. De Angelis, C.G. Rizzello, F. Minervini e M. Gobbetti

Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

L'epidemiologia dell'intolleranza alimentare al glutine è in continua espansione. I dati più recenti riportano una prevalenza di un individuo ogni ca. 100 nella popolazione europea e del Nord America. Sebbene la predisposizione genetica alla patologia sia stata ampiamente dimostrata, diversi fattori ambientali possono avere un'incidenza sulla prevalenza e manifestazione dei sintomi clinici. Tra questi fattori, la biotecnologia di produzione è in grado di influenzare la tolleranza agli alimenti a base di cereali prima della loro assunzione. Il Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata ha condotto alcuni studi (1, 2, 3, 4, 5) che hanno dimostrato come l'uso di “lievito naturale” selezionato e lunghi tempi di fermentazione possano essere considerate opzioni biotecnologiche in grado di garantire una probabile tolleranza ai derivati a base di cereali. Batteri lattici selezionati per l'attività proteolitica sono stati inclusi nella formulazione di un “lievito naturale” da impiegare come starter naturale per la produzione di pane in aggiunta ad enzimi proteolitici di origine microbica, anch'essi usualmente impiegati nella biotecnologia dei prodotti lievitati da forno. Il “lievito naturale” selezionato è stato impiegato per una lunga fermentazione (24-36 h a 30°C) di un impasto liquido di farina di grano. I riscontri analitici, ottenuti mediante elettroforesi bidimensionale, spettrometria di massa ed anticorpi monoclonali, hanno rivelato un contenuto in glutine inferiore a 20 ppm, valore che costituisce la soglia per definire un prodotto gluten-free come stabilito dal Codex Alimentarius. L'impasto così ottenuto può essere usato per produrre pane secondo due opzioni: (i) miscelazione diretta con farine tollerate (es. miglio e/o grano saraceno) e fermentazione con lievito di birra; (ii) disidratazione mediante essiccamento e fermentazione con lievito di birra di sola farina di grano pre-digerita, previa aggiunta di agenti strutturanti (es., gomme e/o amidi modificati). La biotecnologia proposta è stata applicata con successo anche per la produzione di pasta da semola di grano duro e per la fermentazione di farina di segale. Ai riscontri di tipo analitico, sono seguite una serie di sperimentazioni in vivo ed in vitro. Grazie alla collaborazione del Dipartimento di Pediatria e Gastroenterologia dell'Università degli Studi di Napoli è stato dimostrato, mediante determinazioni di permeabilità intestinale, che la totalità dei pazienti celiaci in remissione sottoposti alla sperimentazione ha tollerato l'ingestione di 2 g di glutine. Una serie di riscontri in vitro condotti in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità e con il Center for Celiac Research (University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA) ha confermato i risultati mediante test di: (i) infiltrazione di linfociti su prelievi biotici di mucosa intestinale di celiaco; (ii) rilascio di zonulina da cellule intestinali di ratto; e (iii) produzione di γ -interferone da PBMC.

Celiachia, lattobacilli, glutine, linfociti, zonulina

TOLLERANZA AGLI STRESS ABIOTICI IN LATTOBACILLI GENETICAMENTE MODIFICATI

D. Fiocco, A. Vernile, S. Massa, G. Spano

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Foggia, Via Napoli, 25 - 71100 Foggia

La risposta agli stress abiotici è un comportamento comune da parte di organismi vegetali o animali che reagiscono con rapidi cambiamenti nel loro genoma a stimoli esterni quali ad esempio alte e basse temperature, variazioni di pH o etanolo, presenza di metalli pesanti etc. Questi cambiamenti sono generalmente caratterizzati dalla induzione e sintesi di proteine da stress ad alto (115-60 kDa) e basso (15-30 kDa) peso molecolare. Anche se alcune di queste proteine sono inducibili da stress specifici, la maggior parte presenta una risposta generale a stress diversi. Nel laboratorio di microbiologia molecolare della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Foggia, sono stati clonati, dalla specie *Lactobacillus plantarum* precedentemente isolata da mosti in fermentazione, tre geni appartenenti ad una famiglia di "small heat shock proteins" e denominati *hsp 18.5*, *hsp 18.55* ed *hsp 19.3* (1, 2). Questi geni, già caratterizzati, sono inducibili in risposta a diversi stress (alte e basse temperature, bassi valori di pH, alte concentrazioni di etanolo) suggerendo un loro ruolo nella risposta generale agli stress da parte della cellula, non confinata esclusivamente ai cambiamenti di temperatura (3, 4). Sono state successivamente isolate e caratterizzate le regioni fiancheggianti non codificanti poste alle estremità 5' dei tre geni, e sono state identificate delle sequenze regolatrici non usuali per la specie in esame (1, 2). Successivamente, i tre geni precedentemente isolati sono stati inseriti in batteri lattici appartenenti alla specie *L. plantarum* e precedentemente isolati nel nostro laboratorio (ceppo denominato Lp 90) o utilizzati come "reference" strain (ceppo denominato NC8). Per tale scopo i tre geni sono stati inizialmente amplificati da DNA genomico mediante oligonucleotidi contenenti dei siti per enzimi di restrizione. Sono stati successivamente fusi ad un promotore forte (in grado cioè di produrre diverse copie del gene in esame) isolato dal gene codificante per l'enzima lattico deidrogenasi e veicolante gli stessi siti di restrizione presenti sugli oligonucleotidi utilizzati per amplificare i geni "heat shock". Il promotore è stato identificato nello stesso batterio (*L. plantarum*) utilizzato per gli esperimenti di trasformazione. I geni ricombinanti sono stati successivamente introdotti in un vettore di espressione (successivamente denominato pGIUS900Z) in grado di originare diverse copie del gene ricombinante introdotto (è un cosiddetto "vettore multicopy"). Ai vettori così costituiti è stata inoltre aggiunta, all'estremità 3', una sequenza di terminazione della trascrizione. I vettori sono stati replicati in cellule rese competenti di *Escherichia coli* ed inseriti, mediante elettroporazione in *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. jonnsonii*. I ceppi positivi, veicolanti i tre geni in esame, sono risultati essere tolleranti oltre che a stress termici (alte e basse temperature) anche a stress da bassi valori di pH, metabisolfito, e solventi (12% etanolo e 1% butanolo).

PRESENZA E CARATTERIZZAZIONE GENICA DELL'ENZIMA GLUTAMMATO DEIDROGENASI IN *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

C. Lazzi, V. Bernini, M. Ventura, M. Gatti, J. De Dea Lindner, E. Neviani

Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione, Università degli Studi di Parma, via Usberti 11/A, 43100, Parma, Italia

L'enzima glutammato deidrogenasi (GDH) catalizza la deaminazione ossidativa reversibile del glutammato in α -chetoglutarato ed ammoniaca utilizzando, come cofattori, il NAD e NADP. Le GDH sono enzimi ubiquitari impiegati in parte nell'assimilazione dell'ammoniaca, nella biosintesi del glutammato e, in parte, nel catabolismo del glutammato per la produzione di energia tramite il ciclo di Krebs. Sono enzimi presenti in differenti specie di batteri lattici utilizzati nell'industria alimentare dove svolgono un ruolo fondamentale nel processo di conversione degli aminoacidi in molecole aromatiche. Lo scopo di questo lavoro è stato valutare la presenza dell'enzima all'interno della specie *Streptococcus thermophilus*, analizzare la biodiversità esistente ed approfondire alcuni aspetti legati all'espressione del gene *gdh*, codificante per l'enzima glutammato deidrogenasi.

Il gene *gdh* è stato ricercato in un ampio numero di ceppi di *Streptococcus thermophilus* attraverso tecnica PCR e slot blot hybridization. Per studiare i livelli di espressione di *gdh* in relazione a differenti condizioni di crescita è stata effettuata l'analisi trascrizionale (Northern blot hybridization, slot blot hybridization) nei tre ceppi coltivati in presenza di diverse fonti di carbonio, in tre momenti della crescita esponenziale. L'analisi bioinformatica è stata lo strumento per analizzare la biodiversità del locus *gdh* presente all'interno della specie. Dallo studio è emerso che il gene *gdh* è ampiamente distribuito in differenti batteri e fortemente conservato nella specie *Streptococcus thermophilus*. L'interesse per lo studio dell'enzima glutammato deidrogenasi in una specie di esclusiva origine casearia, come *Streptococcus thermophilus*, è dovuto alla sua correlazione con l'incremento della produzione di molecole aromatiche nei formaggi. La selezione di ceppi di *Streptococcus thermophilus* caratterizzati da elevati livelli di attività GDH e lo studio della biogenesi dell'enzima in questa specie dovrebbero consentire l'ottimizzazione della formazione degli aromi in formaggi e latte fermentati.

Glutammato deidrogenasi, *Streptococcus thermophilus*, Northern blot hybridization, slot blot hybridization.

ANALISI RAPD-PCR PER VALUTARE L'INFLUENZA DELL'HABITAT SUL POLIMORFISMO GENETICO IN LIEVITI DI ORIGINE ALIMENTARE

A. Capece¹, V. Serafino¹, J. Arizon², P. Romano¹

¹Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali – Università degli Studi della Basilicata, viale dell'Ateneo Lucano, n° 10 – 85100 Potenza; e-mail: capeceang@yahoo.it

²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Jalisco, México.

La popolazione di lieviti fermentativi presenti nelle diverse matrici alimentari è fortemente influenzata dai parametri ambientali, tipici dell'habitat di isolamento del lievito e che esercitano una forte pressione selettiva sulla microflora presente. Nell'ambito dei ceppi selvaggi di lieviti fermentativi isolati da diverse matrici è stato ritrovato un elevato grado di variabilità sia per caratteristiche di tipo fenotipico che a livello genetico. Il crescente interesse per l'individuazione della variabilità genetica naturale presente nei vari ecosistemi ha portato ad un'ampia diffusione degli approcci di tipo molecolare, basati sul polimorfismo genetico del DNA, mediante i quali è stata ritrovata una significativa variabilità genetica tra ceppi appartenenti alla stessa specie. La determinazione del grado di biodiversità esistente tra ceppi selvaggi può essere utilizzata come strumento per la selezione di ceppi in possesso di caratteristiche tecnologiche interessanti. In questo lavoro sono riportati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione mediante analisi molecolare di ceppi delle specie più frequentemente ritrovate nei processi fermentativi a carico degli alimenti. I ceppi analizzati, appartenenti alle specie *S. cerevisiae*, *H. uvarum* e *D. hansenii*, sono stati isolati nel corso del processo fermentativo di matrici alimentari di composizione e provenienza diverse. Il DNA dei ceppi è stato sottoposto ad amplificazione mediante analisi RAPD-PCR, utilizzando *primers* diversi in funzione della specie analizzata; in particolare, i *primers* saggiati sono stati M13 (GAGGGTGGCGGTTCT), (GTG)₅ e P80 (5CGCGTGCCCA3). Il polimorfismo genetico in alcuni lieviti, isolati da bevande fermentate diverse ed appartenenti a specie diverse, è stato valutato mediante analisi AFLP. L'analisi statistica dei profili molecolari ottenuti dalle tecniche molecolari saggiate ha messo in evidenza l'esistenza di un elevato grado di polimorfismo genetico tra ceppi della stessa specie, alcuni dei quali hanno esibito profili molecolari unici. Inoltre, in alcuni casi è stata ritrovata una stretta correlazione tra i profili genetici e la fonte di isolamento dei ceppi. Poiché lo studio ha riguardato ceppi selvaggi prelevati direttamente dalla matrice naturale, la variabilità genetica evidenziata potrebbe essere collegata alla pressione selettiva dell'habitat che ha favorito lo sviluppo di una microflora specifica. Questi ceppi, risultato di questa selezione naturale, potrebbero essere interessanti per possibili applicazioni tecnologiche come colture starter per specifici processi fermentativi. L'ottenimento di profili molecolari ceppo-specifici ha, inoltre, una applicazione utile anche per seguire l'evoluzione di questi ceppi nel corso del processo fermentativo, assicurando in tal modo un controllo microbiologico delle fermentazioni inoculate con colture starter selezionate.

Lieviti fermentativi, polimorfismo genetico, RAPD-PCR, AFLP

CORRELAZIONE FRA BIOSINTESI DI MANNOPROTEINE E COMPORTAMENTO FERMENTATIVO IN CEPPI VINARI DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

G. Zara¹, M. Budroni¹, G.A. Farris¹, S. Zara¹, H.J.J. van Vuuren²

¹ Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Sezione di Microbiologia Generale ed Applicata, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italia

² Wine Research Centre, The University of British Columbia, V6T 1Z4, Vancouver, Canada

Durante la fermentazione del mosto d'uva diversi fattori ambientali possono condizionare l'attività fermentativa dei lieviti e provocare, in alcuni casi, rallentamenti/arresti di fermentazione. Questo problema è particolarmente ricorrente nelle vinificazioni in bianco a causa dello scarso contatto bucce-mosto e delle eccessive chiarifiche che impoveriscono il mosto di lipidi insaturi (ergosterolo ed acidi grassi), necessari per mantenere sia la corretta fluidità della membrana plasmatica sia l'attività delle proteine ad essa associate. Per capire i meccanismi di adattamento messi in atto dal lievito nel corso di fermentazioni in assenza di ossigeno e di lipidi esogeni, sono stati analizzati, mediante metodica microarray, due ceppi di *S. cerevisiae* con differente sensibilità agli arresti di fermentazione. I risultati ottenuti hanno evidenziato, nel ceppo sensibile, la mancata attivazione dei geni della famiglia *DAN/TIR*, che codificano per mannoproteine fondamentali per l'adattamento di *S. cerevisiae* alle condizioni di anaerobiosi. In generale, le mannoproteine della parete cellulare del lievito rivestono una grande importanza in tutto il processo di vinificazione (assorbimento dell'ocratossina A, esaltazione delle componenti aromatiche del vino, prevenzione della formazione di torbidità, ecc). La correlazione da noi osservata fra regolazione dei geni *DAN/TIR* e comportamento fermentativo suggerisce come le mannoproteine di parete svolgano un ruolo importante nella risposta del lievito alla carenza di lipidi esogeni nel mosto.

Ceppi vinari di *S. cerevisiae*, microarray, arresti di fermentazione, mannoproteine.

ASPETTI MICROBIOLOGICI E DI BIOSOPPRESSIVITÀ IN RESIDUI AGRO-ALIMENTARI COMPOSTATI

G. Alfano, C. Belli, G. Lustrato, G. Ranalli

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Ambientali e Microbiologiche (DISTAAM), Università degli Studi del Molise, Campobasso

La moderna agricoltura e le rigide regole del mercato spesso impongono la monocoltura, elevate produzioni unitarie e il ricorso a colture protette per anticipare la collocazione sul mercato dei prodotti ortofrutticoli. Ciò comporta alcuni effetti secondari negativi tra i quali, la diminuzione di sostanza organica dei suoli e lo sviluppo di microrganismi patogeni delle colture. Inoltre, diversi agrofarmaci e concimi chimici impiegati in campo possono, attraverso la catena alimentare, arrivare al consumatore con gravi rischi per la salute umana.

Biomasse e residui dell'attività agro-alimentare, trattati biologicamente attraverso il processo di compostaggio, potrebbero assicurare al suolo l'effettivo apporto di sostanze nutritive e miglioratrici delle qualità del terreno (effetto fertilizzante ed ammendante) e la possibilità di contribuire biologicamente alla lotta nei confronti di patogeni e parassiti delle colture agrarie.

A tale scopo, l'attività antagonista-soppressiva di compost maturi è stata caratterizzata e valutata *in vitro* ed *in vivo* nei confronti di diversi microrganismi fitopatogeni.

I risultati mostrano una marcata riduzione *in vitro* della crescita di *Verticillium dahliae* e di altri funghi fitopatogeni posti in contatto con estratti acquosi di compost. Tale inibizione della crescita è risultata diminuire o scomparire con l'uso di estratti acquosi sterilizzati. In prove condotte *in vivo* su piantine di olivo di due anni allevate su terreno inoculato con microsclerozi di *V. dahliae*, l'aggiunta al suolo del 15% (p/p) di compost maturo o del fungo micoparassita *Trichoderma viride* o di entrambi al 15% (p/p) ha causato la significativa riduzione della densità di microsclerozi di *V. dahliae* nel suolo. Inoltre, in prove di soppressività condotte su piante di pomodoro nei confronti della maculatura batterica delle foglie causata da *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 110c, il fungo antagonista, *Trichoderma hamatum* 382, isolato da compost, ha causato la significativa riduzione dell'incidenza della malattia foliare mediante induzione nelle piante di meccanismi di resistenza sistemica.

I risultati del presente studio indicano come compost maturi da residui oleari possono essere efficacemente utilizzati in sistemi di agricoltura biologica ed integrata come ammendanti e fertilizzanti organici eco-compatibili di qualità. Infatti, in virtù della benefica carica microbica residua rappresentano una strategia alternativa per il controllo biologico di microrganismi fitopatogeni. Pertanto, tale soluzione potrebbe tradursi in un minor impiego di fungicidi e fitofarmaci di sintesi, nel pieno rispetto del consumatore e della sempre più rigida normativa in materia di agricoltura eco-compatibile e con minori costi di produzione.

Compost soppressivo, Biocontrollo, Trichoderma, Biopesticidi.

POTENZIALI APPLICAZIONI DEI CIANOBATTERI BIOATTIVI

N. Biondi, L. Rodolfi, M.R. Tredici

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli Studi di Firenze
P.le delle Cascine, 24 – 50144 Firenze, Italy

Il potenziale dei cianobatteri come produttori di molecole bioattive è stato fino ad oggi poco sfruttato dall'industria, sia agrochimica, sia farmaceutica, sia cosmetica. Essendo un gruppo microbico ancora poco indagato, la possibilità di trovare nuovi principi attivi è ancora piuttosto elevata, per cui negli ultimi anni vi è stato un aumento di interesse nei confronti dei cianobatteri, da secoli sfruttati in campo agrario per la loro capacità di fissare l'azoto atmosferico.

Da diversi anni presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze la bioattività cianobatterica viene studiata da diversi punti di vista: agrario, come attività antimicrobica, insetticida, nematocida e fito-ormonale; farmaceutico, come attività antimicrobica e antitumorale; cosmetico, prevalentemente come attività antiradicalica.

Sono stati condotti screening su estratti di biomasse di ceppi cianobatterici della collezione del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie e di quella a comune con l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del CNR di Firenze, oltre che su estratti di comunità cianobatteriche termali.

Da uno screening iniziale per l'attività antifungina, antibatterica e citotossica, condotto su 50 ceppi di *Nostoc* (Piccardi *et al.*, 2000), sono stati selezionati 11 ceppi per ulteriori prove, su 12 funghi patogeni vegetali, 2 insetti di interesse agrario ed un nematode modello (dire quale) (Piccardi, 2001). Alcuni dei ceppi testati hanno mostrato attività interessanti e sono stati indagati anche per verificarne il loro potenziale come erbicidi (Biondi *et al.*, 2004).

Tramite l'utilizzo di biosaggi sono stati testati gli estratti di 86 ceppi cianobatterici per attività di tipo citochinico e di tipo auxinico, riscontrando un'elevata frequenza di quest'ultima (Biondi, 2004). Sono inoltre in corso screening su alcuni ceppi per verificare la presenza della BMAA, analogo del glutammato per il quale si ipotizza un coinvolgimento nella SLA (Stipa *et al.*, 2006).

L'attività di tipo antiradicalico è stata valutata su numerosi estratti di *mat* e *biofilm* cianobatterici di ambienti termali, oltre che su ceppi isolati dagli stessi ambienti. L'attività è stata riscontrata sia in estratti lipofili che in estratti idrofili e sembra prevalentemente legata alla presenza di pigmenti come carotenoidi e ficobiliproteine (Biondi *et al.*, 2005).

Alcuni dei ceppi risultati attivi nel corso degli screening sono stati coltivati in coltura massiva (Rodolfi *et al.*, 2002; Biondi, 2004). E' stato così possibile ottenere grosse quantità di biomassa, ma anche evidenziare alcune delle difficoltà che si incontrano nella produzione di molecole bioattive, come per esempio la scomparsa della bioattività durante la coltura o la raccolta.

DIVERSITÀ, ECOFISIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE DEI PROCARIOTI NEI BACINI ANOSSICI IPERSALINI PROFONDI DEL MEDITERRANEO ORIENTALE

D. Daffonchio, S. Borin, T. Brusa, L. Brusetti

DISTAM, Università degli Studi di Milano, 20133 Milano. daniele.daffonchio@unimi.it

I bacini anossici ipersalini profondi (Deep Anoxic Hypersaline Lakes, DHAL) del mar Mediterraneo Orientale sono laghi sottomarini originati dalla dissoluzione dei depositi salini precipitati nel Miocene (evaporiti). Contengono brine caratterizzate da una salinità totale superiore al 30%, assenza di luce, elevata pressione, variabili pH e composizione ionica. La netta differenza di densità tra le brine e l'acqua marina agisce come una barriera che limita gli scambi di ossigeno, rendendo l'ambiente anaerobico e ricco in solfuri. Ogni bacino mostra peculiarità ambientali, in particolare Discovery ed Urania sono gli ambienti marini più ricchi rispettivamente di magnesio e solfuri.

In questo lavoro l'ecologia e la fisiologia delle comunità microbiche estremofile dei DHAL sono state caratterizzate con un approccio multi-disciplinare. I risultati hanno dimostrato che la vita è possibile in un bacino ipersalino prossimo alla saturazione di NaCl (4,2 M) o MgCl₂ (5 M). La caratterizzazione delle brine contenute nei DHAL ha rivelato attività *in situ* eterotrofa, di solfato riduzione e di metanogenesi. Ciascun bacino ospita una peculiare comunità microbica ricca in diversità, ed in tutti sono stati rilevati archeobatteri appartenenti ad un nuovo gruppo tassonomico affiliato agli *Euryarchaeota*.

Un peculiare sistema campionamento ha permesso la fine dissezione del gradiente chimico spesso 2,5m nella zona di interfaccia tra le brine ipersaline del bacino Bannock e la sovrastante acqua marina, alla profondità di 3,3 km. I risultati hanno dimostrato che questo ambiente ospita una comunità microbica attiva e ricca in biomassa, dominata da Batteri piuttosto che Archaea, che comprende 4 principali nuove divisioni di batteri. Le attività metaboliche misurate *in situ* erano significativamente superiori nel chemoclino rispetto all'acqua sovrastante ed alle sottostanti brine, ed un'analisi funzionale dei ceppi batterici isolati ha indicato che in questo ambiente è presente un'ampia gamma di processi biologici. La distribuzione verticale della quantità, diversità ed attività procariote rilevate lungo il gradiente mostravano valori massimi a particolari livelli di salinità. Molti taxa procarioti erano confinati a salinità definite, chiaramente influenzati dall'abbondanza dei diversi accettori terminali di elettroni e dalle fonti disponibili di energia, come dal livello di stress imposto dalla salinità crescente lungo il chemoclino. Collettivamente le comunità microbiche in questa zona di interfaccia formavano un ecosistema ricco in biodiversità e finemente stratificato, con sufficiente biomassa per contribuire potenzialmente alla formazione dei depositi geologici organici.

Geni funzionali rilevati in librerie metagenomiche e ceppi microbici isolati dai DHAL sono prodotti che presentano diverse attività che possono essere trasferite in innovative applicazioni biotecnologiche.

Laghi ipersalini, comunità microbiche estremofile, applicazioni biotecnologiche

QUANTIFICAZIONE DELLE DISTANZE DI COMUNICAZIONE INTERCELLULARE QUORUM SENSING MEDIANTE ANALISI DI IMMAGINE IN MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

E. Polone¹, F. B. Dazzo², M. Basaglia¹, S. Casella¹, A. Squartini¹

¹Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova, Viale dell'Università 16, 35020, Legnaro, Padova. ² Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA.

La comunicazione intercellulare gioca un ruolo importante nello sviluppo degli organismi viventi, inclusi i batteri. Una tale coordinazione richiede una comunicazione tra cellule il cui vocabolario, per la maggior parte dei Gram-negativi, è costituito da piccole molecole segnale, identificate come N-acil omoserina lattoni (AHL). La molecola segnale è percepita dalle cellule quando sia stata raggiunta una concentrazione soglia, indicativa di un quorum di produttori, da cui il nome *quorum sensing*. In sistemi quali i biofilm microbici la concentrazione extracellulare di AHL in un dato punto del sistema può pertanto essere interpretata genericamente come funzione della densità di popolazione dell'organismo, ma più precisamente della distanza di quel punto dalle cellule che producono il segnale. Ipotizzando che il reale meccanismo alla base del processo non sia legato alla densità di popolazione quanto piuttosto ai reciproci rapporti posizionali, questo modello di comunicazione tra cellule batteriche è stato studiato utilizzando un sistema in vitro. Sono stati impiegati due microrganismi, l'uno produttore e l'altro sensore di AHL. Il primo consiste in *Pseudomonas aeruginosa* MH211, esprime la proteina rossa fluorescente (RFP) che ne permette la facile rilevazione con microscopia a fluorescenza, e che costitutivamente produce diverse AHL. Il reporter utilizzato è stato *Escherichia coli* JB357 con la fusione genica luxR PluxI-gfp(ASV), che esprime la proteina verde fluorescente (GFP) in risposta ad una sufficiente concentrazione esterna di AHL prodotti da *P. aeruginosa*. I due microrganismi sono stati mescolati in concentrazioni e proporzioni variabili in LB agar disciolto e versato su vetrini da microscopio coprendoli rapidamente con vetrino coprioggetti in modo da costituire un sistema tridimensionale a cellule fisse in matrice gelificata, permeabile alle molecole segnale ed osservabile al microscopio.

Usando microscopia computer-assistita con il software CMEIAS è stata misurata l'effettiva distanza media, massima e minima di comunicazione tra ceppo produttore e ceppo sensore a risoluzione di singola cellula. Sono stati sottoposti ad analisi in totale 697 casi. Si è osservata effettiva comunicazione anche tra due sole singole cellule. Inoltre la quantità di AHL prodotte da una sola cellula di *Pseudomonas aeruginosa* è stata in grado di attivare colonie contenenti fino a 180 cellule sensori. Questi risultati portano verso una ridefinizione del concetto convenzionale secondo il quale sarebbe necessario un "quorum" di alta densità di popolazione per raggiungere una concentrazione esterna delle molecole segnale tale da assicurare una efficace comunicazione cellulare. Il termine Positional Sensing appare più consono alla descrizione dei fenomeni di comunicazione intercellulare.

Quorum sensing, comunicazione cellulare, N-acil omoserina lattoni, CMEIAS

COMPOSIZIONE E ATTIVITÀ POTENZIALE DELLA COMUNITÀ DI BATTERI AMMONIO-OSSIDANTI IN UNA *CONSTRUCTED WETLAND* PER LA DEPURAZIONE DI REFLUI CASEARI.

R. Gorra*, M. Coci**, R. Ambrosoli*, H.J. Laanbroek**

* DIVAPRA, Microbiologia e Industrie agrarie, Università degli Studi di Torino

** NIOO KNAW, The Netherlands

Le *constructed wetlands* sono efficienti sistemi, economici e a basso impatto ambientale, per il trattamento delle acque reflue industriali e agricole. Nell'ambito di una ricerca volta a minimizzare la superficie necessaria alla costruzione di tali impianti, è stato valutato l'impiego di materiali atti ad aumentare l'efficienza depurativa di una *constructed wetland* per il trattamento dei reflui di un caseificio di medie dimensioni, in Valle d'Aosta. L'impianto è costituito da una trincea impermeabilizzata, della superficie di 200 m² e profonda circa 1 m, suddivisa in 5 settori riempiti nell'ordine da ghiaia, materiale ceramico di discarica, magnetite, zeolite e suolo mischiato con polvere di marmo e compost. Il refluo fluisce attraverso i settori per effetto di una pendenza della trincea di circa il 3%. Nei settori sono state messe a dimora idrofite appartenenti alla specie *Phragmites australis*.

Il turnover dell'azoto in una *constructed wetland* è influenzato da molte attività microbiche ma l'ossidazione dell'ammonio da parte dei batteri ammonio-ossidanti è generalmente considerata come reazione critica, in grado di influenzare l'entità dell'intero processo. Nella presente ricerca è stata valutata l'attività potenziale, la diversità e distribuzione dei batteri ammonio-ossidanti nei diversi settori della *constructed wetland*.

L'attività è stata valutata mediante la misura della nitrificazione potenziale. La diversità e la distribuzione sono state analizzate mediante separazione di amplimeri di PCR, specifici per batteri ammonio-ossidanti, su gel di poliacrilammide con gradiente denaturante (DGGE), su DNA estratto dai medesimi campioni utilizzati per la determinazione dell'attività di nitrificazione potenziale. Inoltre, l'effetto della temperatura e l'influenza della presenza di *Phragmites australis* sono stati valutati analizzando campioni prelevati nelle zone radicali delle piante e in zone prive di radici in diversi periodi dell'anno.

L'attività di nitrificazione potenziale è risultata influenzata dall'andamento stagionale. Questa influenza, evidente anche da un punto di vista quantitativo (in estate i valori di nitrificazione potenziale erano superiori), si è manifestata soprattutto in un differente grado di omogeneità dei valori ottenuti nell'ambito dei singoli campionamenti. Quando le temperature sono inferiori e l'ambiente più sfavorevole, l'influenza di altri fattori sembra diventare più evidente.

In media il settore contenente zeolite ha manifestato attività potenziale maggiore e più costante rispetto agli altri settori. Non è stata verificata alcuna influenza positiva della presenza delle *Phragmites australis* sull'attività potenziale di nitrificazione, fatta eccezione per l'ultimo settore della *constructed wetland*, contenente suolo.

La popolazione di ammonio ossidanti presenti nella *constructed wetland* è dominata da specie appartenenti al gruppo delle Nitrosospire. Le specie ritrovate mediante analisi PCR-DGGE sono associate a specie-tipo isolate da ambienti terrestri.

Constructed wetlands, nitrificazione potenziale, batteri ammonio-ossidanti.

RUOLO DEI MICRORGANISMI NEL CICLO BIOGEOCHIMICO DELL'ARSENICO E LORO POSSIBILE UTILIZZO PER LA DETOSSIFICAZIONE DI SITI CONTAMINATI

E. Bellina, M. De Bertoldi, M. Civilini

Università degli Studi di Udine - Dipartimento di Scienze degli Alimenti -
Sezione Microbiologia Industriale ed Agro-Ambientale
Via Marangoni 97, 33100 Udine – Italy

L'arsenico è un metalloide tossico presente in quattro stati di ossidazione: As(-III), As(0), As(III) e As(V). In ambienti umidi e ossigenati la forma predominante è As(V) sottoforma di arseniato (H_2AsO_4^- e HAsO_4^{2-}), mentre As(III) è maggiormente presente in ambienti anossici sottoforma di arsenito (H_3AsO_3 e H_2AsO_3^-).

I composti dell'arsenico sono presenti in natura a livelli significativi fin dalla comparsa delle prime forme di vita, comportando lo sviluppo nei microrganismi di meccanismi di As resistenza consistenti in trasformazioni enzimatiche e in sistemi di efflusso localizzati a livello di membrana in grado di pompare ioni tossici dal citoplasma verso l'ambiente esocellulare.

L'attività microbica influenza fortemente la speciazione dell'arsenico attraverso l'applicazione di trasformazioni enzimatiche come la metilazione dell'As inorganico, l'ossidazione dell'As(III) ad As(V) e la riduzione dell'As(V) ad As(III). I microrganismi ossidanti l'As(III) possono essere classificati in due gruppi, i chemiolitoautotrofi (CAOs) e gli eterotrofi (HAOs), mentre i microrganismi in grado di ridurre l'As(V) si suddividono in arseniato-resistenti (ARMs) e in arseniato-respiratori (DARPs).

Nell'ambito del progetto di caratterizzazione di un sito interessato dal fenomeno dell'inquinamento da As si sta studiando il potenziale sfruttamento dell'azione microbica nei processi di *bioremediation* del suolo e delle acque contaminate.

Sono stati applicati metodi di indagine microbiologica, orientati all'individuazione della presenza di metabolismi specifici dell'As in cinque batteri isolati da campioni provenienti dal sito.

Arsenico resistenza, Biodetossificazione, Microrganismi arseniato riduttori, Batteri arsenito ossidanti

INDICATORI MICROBICI DI “EFFETTO PRIMING” IN SUOLI AGRARI GESTITI CON PRATICHE DI SOVESCIO

E. Di Mattia, F. Manganella

Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica (D.A.B.A.C.) - Gruppo di Ricerca in Esoagrobiologia (GREAB), Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

I regolamenti europei 2092/91, 2078/92 e 1257/99 attestano il ruolo centrale dell'agricoltura sostenibile per la salvaguardia delle risorse non rinnovabili del suolo, così come la sostanza organica e la biodiversità microbica. L'agricoltura sostenibile, che assume in Italia il nome di agricoltura biologica ed agricoltura integrata, incentiva infatti l'adozione delle pratiche agronomiche di sovescio, di inerbimento spontaneo, e più in generale di interrimento dei materiali organici e dei residui vegetali. In realtà a tutt'oggi è noto come l'incorporazione al suolo di sostanza organica fresca, come ad esempio quella delle biomasse delle colture di copertura a scopo di sovescio, provochi talvolta *effetti priming* di aumento delle emissioni di CO₂ dovute all'incremento del tasso di decomposizione e mineralizzazione della sostanza organica del suolo agrario.

Recentemente è stato proposto un modello teorico che giustifica gli *effetti priming* come una risultanza delle interazioni cometaboliche tra le microflorae autoctone e lo zimogeno e ne spiega l'intensità attribuendo un ruolo chiave ai fenomeni di competizione tra i microrganismi r-strategisti e K-strategisti. Si è ritenuto pertanto utile approfondire questo tema di ricerca poiché nel contesto dei numerosi studi inerenti l'habitat agro-ambientale sono stati impiegati con successo alcuni indicatori microbici in grado di definire la posizione delle comunità microbiche nel *continuum r/K*.

Lo studio condotto ha avuto lo scopo di esaminare le possibilità di impiego di alcuni indicatori eco-fisiologici, in grado di descrivere le variazioni nella diversità della comunità microbica coltivabile in termini di cambiamento del tratto fenotipico dominante r e K, per ottenere una predizione degli *effetti priming* indotti dal sovescio di colture di copertura diverse. Ulteriormente si è cercato di ottenere indicazioni utili sull'uso del sovescio in ambiente mediterraneo in riferimento alla presenza del peperone (*Capsicum annuum* L.) come coltura principale. La caratterizzazione microbiologica ha riguardato principalmente campioni di suolo, coltivati con colture di peperone, interessate da diversi trattamenti di sovescio: con loiessa, (*Lolium multiflorum* Lam.), con veccia (*Vicia sativa* Roth.), con colza (*Brassica napus* L.) e terreno nudo.

L'indice di sviluppo delle colonie ha fornito indicazioni utili a definire *effetti priming* particolarmente significativi nelle interfile irrigate delle parcelle con sovescio di colza e in quelle di controllo non sovesciato. Effetti analoghi sono stati osservati nella rizosfera del peperone gestito con il sovescio di veccia e di multiessenza, anche se in questo caso l'*effetto priming*, favorendo l'incremento del tasso di mineralizzazione della sostanza organica azotata, contribuisce al miglioramento dell'*habitat* nutrizionale della pianta.

Selezione r e K, indicatori eco-fisiologici, comunità microbica

VERIFICA DELLA COLONIZZAZIONE DI *BIFIDOBACTERIUM* SPP. ED EFFETTO DI PREBIOTICI NELLA DIETA DI SUINI IN SVEZZAMENTO

M. Modesto¹, M.R. D'Aimmo¹, I. Stefanini¹, M. Mazzoni², P. Travisi², C. Tittarelli³, P. Bosi², B. Biavati¹

¹DiSTA, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università degli Studi di Bologna

²DIPROVAL, Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-ambientale, Università degli Studi di Bologna

³Istituto Zooprofilattico Bruno Umbertini, sezione di Reggio Emilia.

La riduzione all'uso di farmaci spinge a cercare nuove strategie alimentari per migliorare accrescimento, salute, risposta immunitaria dei suini in allevamenti da reddito. Probiotici e prebiotici offrono la possibilità di modulare, da soli o in combinazioni nutraceutiche, la microflora gastrointestinale dell'ospite.

L'integrazione della dieta con bifidobatteri può stimolare positivamente l'ecosistema intestinale, migliorando velocità di accrescimento e utilizzazione della razione alimentare. Sono state valutate le potenzialità probiotiche di bifidobatteri, le capacità prebiotiche di due diverse concentrazioni di frutto- e galattooligosaccaridi, gli effetti sinbiotici di sei combinazioni nutraceutiche.

La verifica della colonizzazione di *Bifidobacterium* spp. nel contenuto di ceco è stata determinata attraverso il metodo culturale classico ed un protocollo di PCR diretta quantitativa, genere specifica.

Si è valutata (64 soggetti) la capacità colonizzante di 12 ceppi selezionati tra le 4 specie *B. breve*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. suis* e *B. choerinum*.

Le migliori potenzialità probiotiche appartengono ai ceppi M 354 e RA 18 di *B. animalis* subsp. *lactis* ed al ceppo SU 891 di *B. choerinum*: la somministrazione comporta una riduzione del pH intestinale, incremento del livello di bifidobatteri nel ceco, assenza di diarrea.

Si sono testate (64 soggetti), le capacità prebiotiche di diverse concentrazioni (2% e 4% della dieta) di due Fruttooligosaccaridi, uno da inulina e uno da barbabietola e di un Galattooligosaccaride da siero di latte.

Un effetto significativo sul livello dei bifidobatteri endogeni si osserva per il FOS da barbabietola al 4%.

Il ceppo RA 18 di *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ed il ceppo Su 891 di *B. choerinum* sono stati testati infine (128 soggetti) combinando quattro diverse dosi di probiotico (0, 10⁷, 10⁹, 10¹¹ ufc/day) con la concentrazione prebiotica di FOS individuata.

Il solo ceppo di *B. animalis* subsp. *lactis* RA 18 determina un significativo aumento di peso corporeo linearmente con la dose somministrata.

Il FOS interagisce sinergicamente con RA 18 incrementando significativamente i bifidobatteri.

Bifidobatteri, Probiotici, prebiotici, sinbiotici, FOS, GOS.

Ringraziamenti: Si ringrazia la Comunità Europea per il Finanziamento al Progetto "Quality low input Food"

INFLUENZA DEI BATTERI ALOFILI ESTREMI NELLA LAVORAZIONE TRADIZIONALE DI ALICI SALATE

M. Aponte, M. Chiurazzi, V. Ventorino, A. Casaburi, R. Sacchi, G. Moschetti

Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Gli archebatteri alofili estremi vivono in natura in ambienti ad elevata concentrazione salina. Pochi sono gli studi che riguardano il ruolo di tali microrganismi nei prodotti conservati sotto sale. Le alici salate costituiscono una tipica produzione mediterranea, la cui valorizzazione passa attraverso la conoscenza delle diverse fasi del processo produttivo che influenzano le caratteristiche organolettiche del prodotto finito e riducono i rischi per la salute del consumatore.

Per definire il ruolo degli alobatteri nelle produzioni di pesci sotto sale, sono state allestite tre lavorazioni sperimentali di acciughe salate inoculando ceppi di alofili caratterizzati da diverse attività enzimatiche: il ceppo CER6a di *Halobacterium salinarum* con attività proteolitica e decarbossilasica, il ceppo 1R di *Haloarcula marismortui* privo di entrambe le attività, nonché una lavorazione di controllo priva di inoculi microbici. Durante la maturazione delle semiconservate sono stati monitorati una serie di parametri microbiologici, la composizione in classi lipidiche e i relativi indici di ossidazione, il contenuto di istamina (influenzata dalle attività proteolitiche e decarbossilasiche delle diverse microflora).

I risultati hanno evidenziato che nella lavorazione di controllo le conte relative a tutti i gruppi microbici analizzati ad eccezione delle Halobacteriaceae, risultano essere molto più alte rispetto a quelle delle lavorazioni inoculate con gli alobatteri. Tale evidenza potrebbe far ipotizzare la presenza di un'attività antagonistica degli alofili nei confronti della restante parte della microflora analizzata. Il monitoraggio del contenuto di istamina durante tutto il processo ha permesso di rilevare, nelle prime fasi, un livello di quest'ultima estremamente elevato nella lavorazione di controllo rispetto a quelle inoculate con i due ceppi. Nelle ultime fasi di maturazione, il contenuto di istamina del controllo ha subito un drastico abbattimento fino ai livelli raggiunti da 1R. La lavorazione fatta con CER6a ha invece raggiunto, nelle ultime fasi del processo, la concentrazione più alta dell'ammina in esame. È ipotizzabile che la flora microbica presente in maggior quantità nella lavorazione di controllo abbia potuto contribuire ad una decarbossilazione spinta dell'istidina durante le prime fasi del processo, ma la stessa microflora sia poi stata in grado di utilizzare tale ammina biogena per i propri processi metabolici.

I risultati dell'analisi sensoriale del prodotto finito hanno evidenziato un maggior gradimento dei campioni inoculati con i ceppi di alofili rispetto al controllo, penalizzato soprattutto da attributi negativi come il rancido e il putrido. La rancidità del controllo trova riscontro anche nel maggior livello di ossidazione rilevata analiticamente.

Archebatteri alofili estremi, alici salate, istamina, analisi sensoriale

APPLICAZIONI DELL'ANALISI METABOLOMICA MEDIANTE FT-IR (FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY) NELL'IDENTIFICAZIONE E DEREPLICAZIONE MICROBICA

P. Rellini, L. Corte, F. Fatichenti, G. Cardinali

Sezione Microbiologia Agroalimentare e Ambientale – DBVBAZ
Università degli Studi di Perugia
Borgo XX Giugno, 74 – 06121 Perugia
Tel 075/5856478 Fax 075/5856470
e-mail: gianlu@unipg.it

L'identificazione dei microrganismi presenta numerose difficoltà dovute a ragioni teoriche, come la mancanza di un'efficace definizione di specie microbica, tecniche, quali il numero limitato di caratteri fenotipici utilizzabili e pratiche come l'elevato costo –in termini di tempo e denaro - legato alle analisi di tipo molecolare. Allo stato attuale delle conoscenze, l'identificazione resta un'operazione lunga e costosa, che ne limitano l'applicabilità in tutte le procedure in cui risultino necessari metodi rapidi e poco costosi.

Da qualche anno è allo studio anche la possibilità di identificare i microrganismi mediante l'analisi di spettrogrammi all'infrarosso ottenuti analizzando direttamente le colture. Questa tecnologia presenta due varianti: la FT-IR (*Fourier-Transform Infra Red spectrometry*) e la spettroscopia Raman. Al di là delle differenze specifiche, queste due metodologie hanno in comune la produzione di spettri che riportano valori di intensità da circa 5000 a 300 cm⁻¹, in tempi ridottissimi ed a bassissimo costo d'esercizio. Queste metodologie sono state impiegate con un certo successo nell'identificazione di batteri e, in alcuni casi, di eucarioti inferiori. La messa a punto completa di questi metodi richiede comunque ulteriori studi.

Gli ambiti in cui tale ottimizzazione può essere sviluppata riguardano i microbi d'origine ambientale, la microflora alimentare, il controllo di organismi industriali geneticamente modificati e non e soprattutto il monitoraggio di microrganismi patogeni d'origine ambientale che risultano essere uno dei maggiori rischi del momento attuale, anche senza considerare eventuali ipotesi di bioterrorismo.

Le attività in corso nel nostro laboratorio sono finalizzate, all'ottimizzazione e standardizzazione delle tecniche, allo sviluppo di algoritmi per ottimizzare e rendere più rapida l'interpretazione dei dati spettrali e allo studio di alcuni gruppi tassonomici di lieviti di elevato interesse ambientale ed industriale (generi *Debaryomyces*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula*) anche in vista di sviluppi organizzativi che contemplino una rete nazionale di identificazione rapida.

Identification, FT-IR, environment, pathogenic microbes, yeast.

**EFFETTI COMBINATI DI LATTOFERRICINA B E ALTE PRESSIONI
SULL'INATTIVAZIONE DI
ESCHERICHIA COLI ATCC 43888**

G. Scolari, M. Bonatti, M. Vescovo, C. Zacconi

Istituto Microbiologia Università Cattolica Piacenza

L'industria alimentare moderna è chiamata a produrre alimenti che conservino sempre più le caratteristiche nutrizionali e di freschezza delle materie prime, mediante una riduzione sistematica della severità dei trattamenti tecnologici di risanamento microbiologico.

La ricerca ha reso disponibile nel decennio scorso una serie di trattamenti di stabilizzazione microbiologica potenzialmente rispondenti a tali esigenze, i più promettenti dei quali sono i trattamenti con le pressioni ultraelevate (UHP). Tuttavia, la necessità di mantenere, talvolta per parecchi minuti, pressioni di 500- 800 MPa per ottenere un soddisfacente abbattimento microbico nella matrice alimentare, costituisce uno dei punti critici per i materiali impiegati nella costruzione degli impianti di trattamento.

La drasticità degli interventi può essere ridotta quando applicati in combinazione con mezzi antimicrobici di origine biologica naturale; tra questi, di particolare interesse alimentare e medico, possiamo citare la lattoferricina B, ottenuta dalla digestione acida della lattoferrina (Lf) ad opera di un enzima digestivo: la pepsina.

Nella presente ricerca sono stati condotti esperimenti di inattivazione di *Escherichia coli* ATCC 43888 a 2°C in Tryptone Soya Broth (TSB), usando trattamenti di UHP combinati con concentrazioni subletali di idrolizzato di lattoferrina B (LfBh).

I risultati suggeriscono che la combinazione di bassi livelli di UHP (200MPa) e dosi di LfBh $0.04 \times \text{MIC}$ (2 mg/mL) è efficace nella inattivazione di *E. coli* ($\Delta \log \text{ufc/mL} = 2$) rispetto ai trattamenti singoli con LfBh ($\Delta \log \text{ufc/mL} < 0.2$). Il danno subletale è stato $>$ di 4 log ufc/mL dopo il trattamento combinato, mentre con LfBh e UHP singoli ha raggiunto soltanto 0.8 e 1.2 log ufc/mL, rispettivamente; inoltre, il recupero completo delle cellule subletalmente danneggiate, incubate in TSB a 37°C, si è verificato dopo 16 h per il primo esperimento e soltanto dopo 1 h negli ultimi.

Le osservazioni in TEM hanno evidenziato che le UHP combinate con LfBh producono granuli densi nel citoplasma, come accade nelle cellule dopo shock osmotici, oltre ad una estrema alterazione delle membrane fino alla completa lisi cellulare. Al contrario, i trattamenti singoli provocano distacchi della membrana secondaria dal peptidoglicano, formazione di vacuoli endocitotici e plasmolisi evidente; inoltre, la minore densità citoplasmatica, rispetto al controllo, suggerisce una probabile perdita di solute dovuta ad una maggiore permeabilità della membrana.

Osservazioni al microscopio in epifluorescenza, usando fluorocromi sensibili al potenziale di membrana, hanno evidenziato che HHP o LfBh singole producono plasmolisi ma senza depolarizzazione della cellula, mentre i trattamenti combinati causano il collassamento del potenziale.

Escherichia coli, inattivazione, lattoferrina idrolizzato, Ultra Alte Pressioni

POTENZIALE BATTERIOCINOGENICO DI BATTERI LATTICI ISOLATI DA GRANI, FARINE E IMPASTI ACIDI

L. Settanni, G. Suzzi, A. Corsetti

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Sezione di Microbiologia Agro-Alimentare ed Ambientale, Università degli Studi di Teramo, V. C.R. Lericci 1, 64023 Mosciano Sant'Angelo (TE), Italy. Tel: +39 (0)861 266897-9. Fax: +39 (0)85 8071509. Email: lsettanni@unite.it

Batteri lattici provenienti da cariocidi (n = 316), farine convenzionali e non-convenzionali (in riferimento all'impiego in prodotti da forno) (n = 60) e impasti acidi (n = 417), per un totale di 793 isolati, sono stati identificati mediante sistemi fenotipici e genotipici e saggiati per la produzione di batteriocine. I ceppi isolati da impasti acidi sono stati classificati come membri dei generi *Lactobacillus* e *Weissella*, mentre da farine e grani sono state identificate specie appartenenti ai generi *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Pediococcus*. Due ceppi di *Lactobacillus plantarum*, due di *Lactobacillus pentosus* ed uno della specie *Lactobacillus rossiae*, tutti provenienti da impasti acidi, sono risultati produttori di sostanze antimicrobiche di natura proteica BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances). Una più ampia produzione di BLIS, sia in termini di ceppi produttori (n = 16) che di spettro d'azione delle sostanze antimicrobiche, è stata riscontrata tra gli isolati da grani e farine, con particolare riferimento a *Enterococcus* spp..

L'attività inibente di alcuni ceppi isolati da impasti acidi (*Lb. pentosus* 2MF8) e cereali (*Lactococcus lactis* M30) è stata valutata *in situ* durante la fermentazione di impasti acidi. I risultati hanno anche dimostrato la possibilità d'impiego di un ceppo batteriocinogenico come coltura protettiva nei confronti di lattobacilli chiave degli impasti acidi, come *Lactobacillus sanfranciscensis*.

APPLICAZIONE DELLA TECNOLOGIA DNA-MICROARRAY PER LA CARATTERIZZAZIONE TASSONOMICA E FUNZIONALE DEI BATTERI LATTICI

A. Castioni, F. Fracchetti, G. E. Felis, K. Zanini, F. Rossi, S. Torriani

Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università degli Studi di Verona, Strada Le Grazie 15, 37134 Verona. Email: sandra.torriani@univr.it

I DNA-microarray hanno trovato ampio sviluppo nell'ultimo decennio in numerose aree scientifiche. La versatilità di questa metodica, basata sull'ibridazione tra acidi nucleici complementari, ha consentito di ottenere dalla sua applicazione un ampio spettro di informazioni diverse.

La tecnologia dei DNA-microarray è stata applicata inizialmente per analisi di espressione. In questo contesto si inserisce un nostro progetto che prevede l'utilizzo di DNA-microarray per confrontare il profilo di espressione tra diversi ceppi di *Oenococcus oeni*, principale microrganismo responsabile della fermentazione malolattica durante il processo di vinificazione. Si intende così valutare la relazione tra la modulazione di espressione di specifici geni e la capacità di adattamento alle condizioni sfavorevoli incontrate nel vino, in ceppi enologici.

I DNA-microarray, inoltre, possono essere impiegati per caratterizzare a livello genomico, la diversità di organismi di interesse. Un esempio è costituito dai microarray diagnostici (*Microbial Diagnostic Microarray*), in grado di differenziare *taxa* d'interesse, trasferendo su questi dispositivi il quadro generale delle relazioni filogenetiche note. A questo proposito, presso i nostri laboratori è stato sviluppato un microarray per la differenziazione di alcune specie del genere *Enterococcus* tramite oligonucleotidi disegnati sulla sequenza di marcatori filogenetici, in corrispondenza di specifici polimorfismi di sequenza.

La disponibilità in banca dati di un numero crescente di genomi batterici sequenziati, ha apportato un rilevante contributo informativo alla microbiologia. La dimensione limitata, rispetto agli organismi superiori, consente di immobilizzare l'intero genoma di un batterio su un unico microarray. Sono attualmente disponibili alcuni supporti commerciali che consentono di confrontare il contenuto genico tra individui diversi. Uno studio di questo tipo è stato affrontato, in collaborazione con il centro NIZO food research (Olanda), per approfondire la biodiversità intra-specifica di *Lactobacillus plantarum*, una specie batterica molto versatile, largamente impiegata nell'industria alimentare. In particolare, sono stati effettuati esperimenti di ibridazione su un microarray costituito da sonde rappresentanti l'intero genoma sequenziato di *L. plantarum* WCFS1. Il profilo di ibridazione ottenuto con ceppi di diversa origine geografica ha permesso di confrontarne l'eterogeneità genetica e di correlare la presenza di determinati geni con le capacità fermentative evidenziate, in un'ottica di genomica funzionale.

I primi risultati in via di acquisizione evidenziano come l'applicazione della tecnica DNA-microarray permette di integrare e sfruttare simultaneamente un gran numero di informazioni, tassonomiche e molecolari già acquisite. Inoltre, permette di evidenziare nuovi aspetti genetici da approfondire per una migliore comprensione della fisiologia di organismi di interesse, quali possono essere i batteri lattici e gli enterococchi.

DNA-microarray, batteri lattici, tassonomia, diagnostica, analisi di espressione, contenuto genico, caratterizzazione funzionale.

MOLECOLE DEL QUORUM SENSING Prodotte da Batteri Endofiti: Quale ruolo rivestono?

M. del Gallo, C. Ercole, P. Cacchio, M. Federle* e B. Bassler*

Università dell'Aquila, Dip. BBA, Coppito, 67010 L'Aquila; *Princeton University, Molecular Biology Dept., Princeton, New Jersey, USA

Lo studio dei batteri naturalmente presenti all'interno delle piante sia spontanee che coltivate, i cosiddetti endofiti, ha permesso l'isolamento di numerosi ceppi potenzialmente utili in agricoltura. Molti di questi batteri, infatti, fissano l'azoto atmosferico, producono sostanze che promuovono la crescita della pianta – auxine in particolare, ma anche citochinine e gibberelline – e la proteggono dai patogeni attraverso la produzione di siderofori, antibiotici, e altre molecole ancora poco note.

Ancora poco noti, inoltre, sono i meccanismi attraverso i quali i microrganismi comunicano con la pianta per costituire e mantenere l'ecosistema endofitico. La *recente* scoperta del ruolo che rivestono alcuni omoserinalattoni (HSL) nella comunicazione tra i batteri, ha aperto un nuovo campo di ricerca che ci permette di capire meccanismi fondamentali nella costituzione e nel mantenimento degli ecosistemi microbici.

Mentre gli HSL sembrano rivestire un ruolo nella comunicazione intraspecifica in molte specie batteriche, in particolare di *Pseudomonas* e di altri batteri affini quali le Burkholderie, altre molecole quali il DPD, un difosfuranone, sembrano essere coinvolte nella comunicazione interspecifica. Il gene *luxS* codifica per il DPD.

Abbiamo analizzato la produzione di queste molecole in alcuni batteri endofiti, utilizzando il batterio *Vibrio harveyi luxS⁻* come ceppo "reporter". I batteri utilizzati sono stati *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia ambifaria*, e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, i quali quando inoculati su varie piante di interesse agronomico, formano un consorzio con ottime capacità colonizzatrici, producono ormoni vegetali, fissano azoto e proteggono la pianta dai patogeni. Tutti i batteri, eccetto *B. ambifaria*, producono DPD. Sono stati poi condotti esperimenti di formazione di biofilm in presenza e in assenza di DPD: tutti i ceppi sono stimolati nella produzione di biofilm in presenza di DPD, eccetto *B. ambifaria*. Infine, utilizzando alcuni primers costruiti sulla base delle regioni più conservate del gene *luxS* di vari batteri, sono state amplificate alcune parti del gene *luxS* di *Herbaspirillum seropedicae*. I risultati ottenuti hanno rivelato una stretta omologia tra il gene *luxS* di *Vibrio harveyi* e quello di *Herbaspirillum*, pur provenendo i due batteri da ambienti completamente differenti: ambiente marino il primo, interno della pianta il secondo.

Ruolo della microbiologia nei settori agro-alimentare ed ambientale

POSTER

BIORISANAMENTO DI SUOLI CONTAMINATI DA GASOLIO IN BIOREATTORE: VALUTAZIONE DELL'IMPIEGO DI COMPOST E SURFATTANTI

M. Taccari, M. Ciani

Dipartimento di Scienze degli Alimenti – Università Politecnica delle Marche
Via Brece Bianche, 60131 Ancona (gruppo.ciani@univpm.it)

L'inquinamento dei suoli da idrocarburi, dovuto a metodi impropri di stoccaggio, a sversamenti accidentali o perdite da serbatoi rappresenta un problema ampiamente diffuso che oggi si trova da affrontare il mondo industrializzato. Di conseguenza negli ultimi anni, in linea con il D.Lgs n.22/97 (Decreto Ronchi), del connesso D.M. n.44/99 e del nuovo D.Lgs n.152/2006, con i quali viene introdotta una nuova ed organica disciplina in materia di gestione delle opere di bonifica dei siti inquinati, si è assistito ad un notevole sviluppo delle tecnologie di tipo biologico. In tale contesto, il presente lavoro ha come obiettivo la messa punto delle condizioni ottimali, in bioreattori da laboratorio, per il biorisanamento di suoli contaminati da gasolio. A tale scopo sono state allestite due prove utilizzando bioreattori con suolo contaminato artificialmente da gasolio (1% in peso). Nella prima prova è stato valutato l'effetto di differenti aggiunte di compost (10%, 15%, 20%) sull'attività degradativa della flora microbica; mentre nella seconda prova è stato osservato l'effetto di quattro surfattanti quali: TritonX-100, Tween 80, β -Ciclodestrine e Ramnolipidi. L'evoluzione microbica è stata valutata mediante la determinazione dei microrganismi coltivabili mentre l'attività complessiva della flora microbica è stata monitorata attraverso la rilevazione dell'attività respiratoria. L'abbattimento del gasolio è stato rilevato mediante l'analisi degli idrocarburi alifatici condotta mediante gas-cromatografia. I risultati ottenuti dalla prima prova hanno messo in evidenza che la percentuale di compost da aggiungere al suolo contaminato è pari al 15% in quanto si è rivelata quella più idonea per sostenere lo sviluppo microbico ed il processo biodegradativo degli idrocarburi. L'aggiunta dei surfattanti, valutata nella seconda prova condotta con l'aggiunta di compost pari al 15%, ha mostrato un ulteriore incremento della microflora coltivabile, dell'abbattimento degli idrocarburi e dell'attività microbica complessiva del suolo.

Tra i diversi surfattanti saggiati, il TritonX-100 e le Ciclodestrine sembrano mostrare una efficacia maggiore nell'aumentare la biodisponibilità degli idrocarburi rispetto agli altri surfattanti.

Nel corso delle prove, sono stati, inoltre, isolati dai bioreattori delle colture microbiche che dopo caratterizzazione tassonomica e fisiologica saranno utilizzati per allestire dei consorzi da impiegare nelle successive prove di biorisanamento in bioreattori.

Biorisanamento, bioreattori, compost, surfattanti.

STRATEGIE PER LA BIO-VALORIZZAZIONE DEI REFLUI OLEARI

M. Taccari, L. Aquilanti, F. Comitini, D. Brughieri, F. Clementi, M. Ciani

Dipartimento Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche 60131 Ancona; e-mail: gruppo.ciani@univpm.it

Le acque di vegetazione delle olive (AVO), che originano dalla loro lavorazione, sono ricche di composti organici (zuccheri, acidi organici, amminoacidi, ecc..) e di sali minerali (potassio, fosforo, calcio, ecc..) e, sebbene siano sostanzialmente prive di fattori di rischio quali agenti patogeni, metalli pesanti, virus, ecc., presentano un carico elevato di polifenoli totali, caratterizzati da spiccata azione antimicrobica e limitata biodegradabilità. In caso di impiego delle AVO nella ferti-irrigazione dei terreni agricoli, queste incidono sulla salubrità del terreno e delle colture, quali olivo, vite e cereali, soprattutto se viene effettuata in tempi inopportuni e/o in quantità inadeguate. Tali caratteristiche pongono il problema di garantire una corretta utilizzazione agronomica dei reflui oleari per evitare che i componenti organici in essi contenuti, possano provocare effetti indesiderati sulla microflora dei suoli e conseguentemente sulla loro fertilità. In questo contesto, appare utile valutare l'impiego di AVO nella produzione di compost di qualità e di biofertilizzanti, al fine di conseguire l'efficace impiego dei reflui oleari in campo agronomico in condizioni di assoluta tranquillità agro-ambientale. Sulla base di tali premesse, la presente indagine si è articolata seguendo due linee di ricerca. La prima linea di ricerca ha verificato l'ipotesi di utilizzare reflui oleari come substrato per lo sviluppo di microrganismi appartenenti alla famiglia *Azotobacteraceae* e destinare il refluo fermentato alla ferti-irrigazione, mentre nella seconda linea di ricerca le AVO sono state utilizzate per il processo di compostaggio di matrici organiche di scarto (biomasse) provenienti dall'attività agricola. Nel corso della prima linea di ricerca sono stati ottenuti 41 isolati di *Azotobacteraceae*, 27 dei quali sono stati testati per la capacità di crescere e abbattere i polifenoli. La selezione condotta ha portato alla selezione di tre isolati, identificati come *Azotobacter chroococcum* mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), per la produzione di biofermentato. Le prove di compostaggio delle AVO con biomasse di scarto hanno mostrato, per tutte le tesi saggiate, una buona percentuale di abbattimento dei polifenoli solubili (superiore all'80%), un buon rapporto AVO/biomassa utilizzata e buoni risultati per quanto riguarda la fitotossicità residua del compost. Dalle prime indicazioni sull'utilizzo del biofermentato (da *Azotobacter*) come "ingrediente" alternativo alle AVO per la produzione di compost, sembrerebbe emergere un'azione positiva di tale biofermentato sul processo.

Acque di vegetazione delle olive , *Azotobacter*, compostaggio, biomasse agricole

BIODEGRADAZIONE DI NONILFENOLI ETOSSILATI MEDIANTE L'IMPIEGO DI BIOREATTORI A CELLULE IMMOBILIZZATE

D. Di Gioia, L. Sciubba, L. Bertin, C. Barberio*, F. Fava

Dipartimento di Chimica Applicata e Scienza dei Materiali, Università di Bologna

* Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze.

I nonilfenoli etossilati (NPnEO, dove n è il numero di unità etossiliche) sono tensioattivi non ionici sintetici largamente usati nell'industria sotto forma di miscele complesse di congeneri aventi catena etossilica di diversa lunghezza. Le acque reflue industriali sono in genere trattate nei depuratori di tipo convenzionale a fanghi attivi, dove i NPnEO a lunga catena etossilica sono bioconvertiti in congeneri a catena etossilica più corta (n= 1, 2, 3) o a 4-nonilfenolo (4-NP). Questi prodotti di biodegradazione sono recalcitranti e più tossici delle molecole parentali. Pertanto, gli effluenti sono sottoposti ad un trattamento terziario per poter essere riversati nell'ambiente; l'ozonizzazione rappresenta attualmente il metodo di trattamento più efficace, ma ha alti costi di gestione. Il trattamento biotecnologico potrebbe rappresentare una via più economica ma efficace per trattare questi reflui.

L'obiettivo di questo lavoro è di sviluppare un processo biotecnologico a cellule immobilizzate per il trattamento dei reflui contaminati da NPnEO risultanti dal trattamento a fanghi attivi.

Nel corso di uno studio precedente è stato selezionato da acque reflue industriali in presenza di 4-NP come substrato di selezione un consorzio microbico in grado di degradare il 4-NP e NPnEO a corta catena etossilica. Tale consorzio è stato utilizzato come biocatalizzatore in questo studio. Sono stati allestiti due reattori a letto fisso, uno impaccato con carbone granulare attivo (GAC) e l'altro con biglie di silice (SB), il consorzio microbico è stato immobilizzato e i reattori sono stati alimentati con una soluzione contenente Igepal CO-520 (una miscela di NPnEO con grado di etossilazione medio di 5) alla concentrazione di 60 mg/L. Inizialmente i reattori sono stati fatti operare in condizioni *batch*, mostrando efficaci capacità degradative senza accumulo di metaboliti tossici. Gli stessi reattori sono stati poi fatti operare in regime continuo e alimentati con Igepal CO-520 a tre diversi carichi organici (1.4, 3.3 e 4.9 mg/L) per un tempo totale di 45 giorni. Le percentuali di mineralizzazione dell'Igepal CO-520 ottenute sono state del 48% e 52% rispettivamente nel reattore GAC e SB. I dati ottenuti evidenziano che i reattori a letto fisso sviluppati in questo lavoro hanno le potenzialità per poter essere utilizzati per il trattamenti di reflui contaminate da NPnEO.

Nonilfenoli etossilati, tensioattivi non ionici, reattori a letto fisso, cellule immobilizzate, biodegradazione

BIODEGRADAZIONE DI FENANTRENE IN MICROCOSMI DI SUOLO: GLUTATIONE S-TRASFERASI COME BIOINDICATORE DI ATTIVITÀ MICROBICA

L. Cavalca, M. Colombo, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, V. Andreoni

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche e Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli Studi di Milano

Un ceppo di *Sphingobium chlorophenolicum*, caratterizzato per la presenza dei geni *phnA1* per 3,4-fenantrene diossigenasi e *bphK* per glutatione S-trasferasi, utilizza il fenantrene come unica fonte di carbonio ed energia e ne accelera notevolmente la degradazione quando inoculato in microcosmi di suolo. L'analisi semi quantitativa di *phnA1* e *bphK* unitamente alla regione ipervariabile V3 del 16S rRNA applicata ai microcosmi di suolo ha dimostrato che il ceppo C3R si sviluppa a partire dal terzo giorno di incubazione e persiste in suolo anche dopo la completa rimozione del fenantrene. La consistenza dei risultati ottenuti con i tre marcatori molecolari, unitamente alla specifica induzione di *bphK* da parte del fenantrene, fanno ritenere che la glutatione S-trasferasi possa essere applicata come marcatore molecolare del ceppo C3R e, mediante analisi dei trascritti su campioni di suolo, come bioindicatore di popolazioni microbiche metabolicamente attive nei confronti di inquinanti ambientali.

Fenantrene, bioaugmentation, glutatione S-trasferasi, 3,4-fenantrene diossigenasi, RT-PCR

Ricerca finanziata dal progetto PRIN 2003: "Selezione di colture batteriche per la degradazione di POP e loro monitoraggio in processi di bioarricchimento di suoli".

EFFETTO DELLA SOLARIZZAZIONE CON FILM PLASTICI BIO – DEGRADABILI SULLA MICROFLORA DEL SUOLO

M. Chiurazzi¹, V. Ventorino¹, G. Bonanomi², G. Del Sorbo², F. Scala², G. Moschetti¹

¹ Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli studi di Napoli “Federico II”

² Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università degli studi di Napoli “Federico II”

La solarizzazione è oggi considerata una delle principali metodologie di disinfestazione del terreno in alternativa all'utilizzo del bromuro di metile. Grazie a tale pratica il terreno preventivamente inumidito e poi ricoperto da un telo di materiale plastico raggiunge temperature tali da devitalizzare buona parte delle principali avversità (microrganismi, insetti, semi di infestanti) delle colture agrarie. L'aggiunta di letame, compost o il fieno sembrano favorire il riscaldamento del terreno e l'effetto benefico della pratica sulle colture.

Due suoli profondamente diversi, uno a tessitura argillosa e l'altro prevalentemente sabbioso, sono stati sottoposti a vari trattamenti, riguardanti l'utilizzo di materiali plastici commerciali e biodegradabili in via di sperimentazione, per valutarne gli effetti sulla componente microbica. Alcuni trattamenti hanno previsto l'accoppiamento dei teli plastici con fieno di erba medica, calciocianammide e con il fungo antagonista *Trichoderma harzianum*, mentre è stato predisposto un controllo utilizzando Dazomet, principio attivo molto efficace nel controllo dei funghi fitopatogeni terricoli. La temperatura del suolo è stata monitorata in continuo sugli appezzamenti sperimentali. Sono state analizzate le popolazioni coltivabili di pseudomonadi (antagoniste di importanti malattie fungine delle piante) e le variazioni della struttura delle comunità batteriche mediante analisi PCR – DGGE. Dopo i vari trattamenti sono state trapiantate le coltivazioni tipiche della zona valutandone la produttività.

In entrambi i terreni è evidente l'effetto del trattamento con Dazomet che provoca aumenti statisticamente significativi delle conte microbiche. Quest'effetto potrebbe essere spiegato con la morte di parte della biomassa fungina e/o batterica, utilizzata successivamente come *pabulum* dalle pseudomonadaceae coltivabili. L'applicazione di calciocianammide invece, in entrambi i terreni, porta ad abbattimenti delle conte statisticamente significativi a causa di un possibile effetto tossico sulle popolazioni microbiche studiate. Anche il trattamento di solarizzazione con apporto di fieno di erba medica fa aumentare le conte microbiche in entrambi i terreni analizzati probabilmente a causa del benefico effetto provocato dall'applicazione del fieno alla parcella in esame. I risultati dell'analisi di regressione lineare fra produttività delle colture e carica di Pseudomonadaceae hanno evidenziato l'importanza delle *Pseudomonas* spp. nell'influenzare la produttività delle specie vegetali testate.

I profili elettroforetici risultanti dall'analisi PCR – DGGE appaiono abbastanza conservati all'interno di ciascun terreno. I trattamenti effettuati, infatti, solo in alcuni casi hanno provocato un'alterazione qualitativa della struttura delle comunità microbiche.

Solarizzazione, pseudomonadaceae, PCR-DGGE, biodiversità microbica

Lavoro finanziato dall'UE nell'ambito del progetto BIO.CO.AGRI. (Biodegradable coverage for sustainable Agriculture).

CARATTERIZZAZIONE DELLA COMUNITÀ MICROBICA DI UN SUOLO CONTAMINATO DA SCARTI DI LAVORAZIONE DELLA PIRITE

E. Dell'Amico¹, M. Colombo¹, S. Foiani¹, L. Crippa², P. Zaccheo², V. Andreoni¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Milano Via Celoria, 2 20133 Milano

²Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli Studi di Milano Via Celoria, 2 20133 Milano

Nell'ambito di una ricerca interdisciplinare sono stati considerati campioni di un suolo contaminato da "ceneri di pirite", scorie prodotte dal processo di arrostitimento ossidante della pirite. Le ceneri contengono grandi quantità di ferro, residui di zolfo e alte concentrazioni di arsenico, rame, zinco, e piombo. Poiché circa il 50% del suolo è costituito da queste ceneri, esso risulta fortemente contaminato da arsenico e da rame. Obiettivo del lavoro è stata la valutazione del rischio ambientale sia immediato che potenziale del suolo, funzione della quantità e del grado di biodisponibilità dei principali elementi tossici e la descrizione delle comunità batteriche presenti.

In questa prima fase del lavoro è stato privilegiato lo studio della frazione coltivabile in quanto è ormai riconosciuto che la presenza di metalli/metalloidi influisce sullo stato fisiologico delle cellule e quindi sulla loro coltivabilità. In particolare, è stata considerata la carica dei batteri eterotrofi totali, degli attinomiceti e dei metallo-tolleranti. La struttura di queste popolazioni è stata studiata mediante analisi DGGE sia con primer generici che gruppo specifici. Dalle colture di arricchimento in presenza di rame, arsenito e arseniato, nichel e zinco, sono state isolate numerose colonie. Gli isolati sono stati caratterizzati per la loro metallo resistenza ed identificati, dopo raggruppamento in *Operational Taxonomic Units* (OTUs), mediante sequenziamento del 16S rDNA. Infine è stata misurata la diversità catabolica della comunità microbica del suolo al fine di correlare la struttura della comunità alla sua funzione. Il suolo è stato inoltre caratterizzato per le sue principali proprietà chimiche e per la quantità di contaminanti in forma totale, solubile e prontamente disponibile.

Pirite, metalli pesanti, DGGE

Ricerca svolta con contributi FIRST 2005

APPLICAZIONE DI AMMENDANTI INORGANICI SU SUOLI CONTAMINATI DA METALLI PESANTI: EFFETTI SULLA VERSATILITÀ CATABOLICA E SULLA STRUTTURA DELLE COMUNITÀ MICROBICHE

G. Garau*, P. Castaldi, P. Deiana*, P. Melis

Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, *Sezione di Microbiologia Generale ed Applicata e Sezione di Chimica Agraria, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari.

In questo studio è stata confrontata l'efficacia di diversi ammendanti inorganici nel ridurre la mobilità di Pb, Cd e Zn, presenti in un suolo contaminato, e nel modificare la struttura e la versatilità catabolica e/o funzionale delle popolazioni microbiche residenti. Una zeolite naturale, fanghi rossi derivanti dalla lavorazione dell'alluminio e carbonato di calcio sono stati separatamente aggiunti ad un suolo contaminato e posti ad equilibrare con questo per circa sei mesi. Il suolo contaminato (Pb 3266 mg kg⁻¹ s.s.; Cd 35.4 mg kg⁻¹ s.s.; Zn 1495 mg kg⁻¹; pH_{H2O} 4.23) non ammendato è stato utilizzato come controllo. Le analisi chimiche eseguite sulle diverse tesi hanno messo in evidenza come l'aggiunta degli ammendanti abbia significativamente ridotto la frazione dei metalli pesanti solubili ($P < 0.05$) e, nel caso del carbonato di calcio e dei fanghi, abbia determinato un aumento del pH (rispettivamente 7.18 e 7.61; suolo/zeolite 4.75). L'aggiunta di zeolite e carbonato di calcio non ha influito sul numero totale dei batteri eterotrofi (valori medi 3*10⁵ ufc g⁻¹ suolo), al contrario i fanghi rossi hanno determinato un significativo incremento (5*10⁶ ufc g⁻¹ suolo; $P < 0.05$). Il numero di microrganismi azotofissatori liberi (aerobi e anaerobi) non è stato influenzato dall'aggiunta di zeolite e fanghi rossi (valori medi di 8*10² ufc/MPN g⁻¹ suolo) mentre nel suolo ammendato con carbonato di calcio è stata osservata una sensibile riduzione (~10 volte). L'analisi multivariata (PCA) del profilo fisiologico ottenuto utilizzando piastre Biolog Ecoplate ha rivelato una differente versatilità catabolica delle comunità microbiche. Le popolazioni microbiche estratte da suolo/fanghi e suolo/carbonato sono risultate tra loro molto simili così come osservato per le comunità presenti in suolo/zeolite e nel controllo. Un'analisi effettuata su stipiti ($n=9$) isolati da suoli di controllo e da quelli ammendati con zeolite ($n=10$) ha rivelato l'esclusiva presenza di batteri Gram+ mentre nelle comunità presenti su suolo/fanghi ($n=11$) e suolo/carbonato ($n=10$) erano egualmente rappresentati batteri Gram+ e Gram-. Nei suoli ammendati con fanghi rossi e zeolite è stata rilevata la scomparsa di forme filamentose e sporigene presenti invece nel suolo di controllo e nel suolo/zeolite. I diversi valori pH nei suoli ammendati e la frazione di metalli pesanti solubili sono apparsi i principali responsabili delle differenze di struttura e versatilità catabolica osservate nei diversi trattamenti. Lo studio mette in evidenza come l'aggiunta al suolo di ammendanti inorganici possa influire in maniera significativa sulla struttura e versatilità catabolica delle comunità microbiche, nonché l'importanza di un approccio combinato chimico/microbiologico per valutare l'efficacia di un ammendante nella *remediation* di suoli metallo-contaminati.

Metalli pesanti, ammendanti, comunità microbica, versatilità catabolica

BIOMINERALIZZAZIONE DI CARBONATO DI CALCIO: RUOLO DI ESOPOLISACCARIDI E POLISACCARIDI CAPSULARI DI BATTERI CALCIFICANTI

C. Ercole, N. Franceschini*, P. Cacchio, M. Del Gallo, A. Lepidi

Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata e *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università dell'Aquila, 67010 Coppito, L'Aquila

Il processo di biocristallizzazione del carbonato di calcio è un fenomeno diffuso tra i diversi raggruppamenti di esseri viventi ed in particolare nel mondo batterico. In appropriate condizioni, molte specie batteriche possono depositare cristalli di calcite sia in vitro che in habitat naturali. Gli studi fatti in questo campo hanno evidenziato la complessità del fenomeno che può essere influenzato da condizioni fisico chimiche ed è correlato alle proprietà metaboliche e strutturali dei microrganismi. Numerosi autori hanno descritto la formazione di calcite ad opera di batteri appartenenti a gruppi tassonomici diversi. Tuttavia i meccanismi attraverso i quali i batteri depositano carbonato di calcio non sono del tutto noti. La carbonatogenesi batterica può trovare importanti applicazioni: nella protezione e consolidamento di monumenti lapidei, nel consolidamento del patrimonio in terra cruda, nel biorisanamento di falde acquifere, nella coibentazione di pozzi petroliferi, essa può intervenire negli equilibri interni alla trasformazione della CO₂ che controllano l'effetto serra. Sono riportati diversi casi di applicazione biotecnologia dei batteri calcificanti su superfici calcaree degradate. Nel nostro laboratorio stiamo sviluppando un nuovo approccio di intervento che esclude le cellule vive e fa uso di matrici cellulari estratte da *Bacillus firmus* (ceppo calcificante). Il ceppo batterico calcificante si sviluppa all'interno di un biofilm da lui stesso prodotto è formato da una matrice polimerica idratata auto-protetta, aderente a una superficie inerte. All'interno del biofilm le cellule o le loro componenti polimeriche agiscono da nuclei di cristallizzazione con formazione di carbonato. In particolare dal ceppo batterico, cresciuto in mezzo colturale con e senza ioni calcio sono state isolate le sostanze esopolimeriche (EPS) e i polisaccaridi capsulari. Il ceppo batterico non calcificante *Bacillus 3PE* è stato utilizzato come controllo negativo.

Le matrici organiche sono state caratterizzate e utilizzate in *vitro* per verificare l'efficacia di ognuna quale fattore di nucleazione di cristalli di calcite. I dati ottenuti dimostrano che: (i) le matrici organiche isolate giocano un ruolo diretto nella formazione dei carbonati; (ii) i cristalli sono formati da calcite come indicato dall'analisi cristallografica (XRD); (iii) studi condotti al SEM dimostrano che i cristalli depositati sono strettamente legati alle matrici organiche; (iv) alcune proteine isolate negli EPS e nei CPS sono sovraesprese o sono inducibili quando i ceppi batterici crescono su mezzi colturali contenenti ioni calcio. La caratterizzazione di tali proteine e il clonaggio dei geni responsabili della loro espressione, consentirà di definire sia le loro funzioni che i meccanismi che sono alla base della loro espressione.

Batteri calcificanti, biorisanamento di monumenti lapidei, EPS e CPS batterici.

DINAMICA DELLA COMUNITÀ AMMONIO-OSSIDANTE TRAMITE PCR IN SITU DEL GENE FUNZIONALE *AMO*A IN UN SISTEMA DI DEPURAZIONE A FANGHI ATTIVI CONTAMINATI DA RAME

F. Villa^a, P. Principi^a, E. Zanardini^b, F. Cappitelli^a, B. Giussani^b, C. Sorlini^a

^aDipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (DISTAM),
Università degli Studi di Milano, Facoltà di Agraria, via Celoria 2, 20133 Milano

^bDipartimento di Scienze Chimiche e Ambientali, Università dell'Insubria, Facoltà di
Scienze, via Valleggio 11, 22100 Como

I batteri chemiolitotrofi ammonio-ossidanti (AOB) ricoprono un ruolo centrale nel ciclo naturale dell'azoto, trasformando aerobicamente l'azoto ammoniacale in nitrito, ottenendo energia metabolica dalla preliminare ossidazione dell'ammoniaca a idrossilamina. Questo fondamentale passaggio biochimico è catalizzato dall'enzima multisubunità ammonio monoossigenasi (AMO), codificato dai geni *amoC*, *amoA* e *amoB* organizzati nell'operone *amo*.

I trattamenti biologici di depurazione a fanghi attivi rappresentano l'applicazione biotecnologica più importante degli AOB, poiché riducono l'apporto di azoto ammoniacale nel corpo idrico ricettore, preservando l'integrità dell'ecosistema acquatico.

Questa ricerca si è posta come obiettivo la caratterizzazione degli effetti del rame sulla struttura e dinamica della comunità AOB nei sistemi biologici ingegnerizzati a biomassa dispersa.

Le sperimentazioni sono state condotte su un impianto pilota per i test sul dosaggio in continuo del metallo, e in scala di laboratorio per le prove batch dei dosaggi puntuali. Il gene funzionale *amoA* è stato individuato all'interno di cellule microbiche intatte mediante amplificazione *in situ* della sequenza target con primer specifici, e reso visibile in epifluorescenza attraverso ibridazione con una sonda opportunamente marcata. È stato quindi possibile individuare cellule coccoidi *amoA*+ raggruppate in cluster e presenti al margine dei fiocchi di fango attivo. Inoltre, è stata evidenziata una correlazione positiva tra la concentrazione di rame nella biomassa e la diminuzione delle cellule ibridate positive.

I diversi campioni trattati sono stati ulteriormente analizzati mediante PCR-DGGE sul gene *amoA*. I profili ottenuti sono stati elaborati mediante analisi delle componenti principali (PCA), per meglio comprendere gli effetti del rame sulla composizione e struttura della comunità batterica ammonio-ossidante, e per valutare le evoluzioni delle popolazioni nelle differenti condizioni sperimentali. Si sono dunque evidenziate variazioni e trend caratteristici nelle comunità esposte al metallo tossico con tempi diversi.

Rame, Fango attivo, *amoA*; PCR *in situ*, PCA

TRATTAMENTI BIOLOGICI PER LA RIDUZIONE DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI IN EMISSIONI GASSOSE DELL'INDUSTRIA DEL LEGNO

M. Civilini

Università degli Studi di Udine - Dipartimento di Scienze degli Alimenti -
Sezione Microbiologia Industriale ed Agro-Ambientale
Via Marangoni 97, 33100 Udine – Italy
marcello.civilini@uniud.it

L'inquinamento da composti organici volatili (COV) interessa tutte le zone industriali delle regioni italiane perché le verniciature, il trattamento delle plastiche, i trattamenti di estrazione e “sgrassaggio” sono procedure comuni di varie attività industriali. Nelle regioni orientali del nord d'Italia vengono emesse alte quantità di COV provenienti soprattutto da aziende medio-piccole del settore legno. La loro diversa tipologia rende difficile proporre un unico sistema per ridurre l'inquinamento che sia al tempo stesso efficiente ed economico. Fra le varie soluzioni la biofiltrazione può essere una tecnologia idonea dato che la comunità microbica può adattarsi e cambiare le proprie potenzialità cataboliche sotto la pressione selettiva dei diversi componenti. A partire da una composizione media di COV presente nelle emissioni di cabine di verniciatura di industrie del legno, una serie di esperienze in scala di laboratorio sono state effettuate per studiare la degradazione microbica di ogni singolo COV presente. I ceppi microbici selezionati sono stati valutati su supporto organico in scala di laboratorio alimentati sia con singoli COV che con miscele di essi. Successivamente, i risultati di queste ricerche sono state applicati utilizzando un reattore pilota di due metri cubi alimentato fino a $100 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ con aria contaminata da una miscela di COV. La quantificazione delle efficienze di rimozione e la speciazione di COV ottenute con diversi carichi organici durante sperimentazioni condotte per molti mesi hanno evidenziato buoni rendimenti da consentirne uno sviluppo industriale.

Composti Organici Volatili (COV), Biofiltrazione, Industrie del legno

FOTOEVOLUZIONE DI IDROGENO DA FERMENTATI OTTENUTI DA RESIDUI VEGETALI

L. Bianchi, F. Mannelli, R. De Philippis

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Firenze

L'obiettivo di questo studio è stato quello di sperimentare la possibilità di produrre idrogeno utilizzando due processi microbici combinati, la fermentazione al buio di residui vegetali di varia origine e la fotoevoluzione di H₂ a partire dai prodotti derivanti dalla prima fermentazione. Per la sperimentazione sono stati utilizzati due tipi di residui vegetali, uno costituito da vegetali selezionati per preparazioni alimentari e l'altro costituito da residui di frutta e verdura del mercato ortofrutticolo generale.

Le fermentazioni di entrambi i substrati vegetali, condotte dai microrganismi autoctoni presenti sui residui, hanno portato alla produzione di vari composti organici e di ammonio in quantità variabili, a seconda della quantità di residui vegetali utilizzata. La maggior concentrazione di prodotti di fermentazione ottenuta è stata la seguente: acido lattico 5,9 gL⁻¹, acido acetico 0,48 gL⁻¹, etanolo 0,94 gL⁻¹ e ammonio 0,12 gL⁻¹.

Per verificare la capacità dei BRNS di utilizzare tali substrati, sono state condotte prove di crescita con *Rhodopseudomonas palustris* 42OL utilizzando sia i fermentati tal quali che dopo aggiunta di ammonio. La crescita osservata è stata sempre paragonabile a quella ottenuta su terreno sintetico, mettendo in evidenza che nei fermentati di origine vegetale non mancava nessuno dei nutrienti necessari per la crescita né erano presenti sostanze inibenti il metabolismo di *R. palustris*. La produzione di H₂, invece, è risultata inibita fino a quando la concentrazione di ammonio non era inferiore a 0,07 gL⁻¹.

Il tasso di produzione medio di idrogeno è risultato pari a 8,7 mLH₂ h⁻¹L⁻¹, paragonabile a quello ottenuto su mezzo sintetico (9,9 mLH₂ h⁻¹L⁻¹). Il gas prodotto conteneva una quantità di H₂ pari al 77% circa del volume di gas sviluppatosi, mentre la percentuale di H₂ presente nel gas prodotto dalle colture condotte su terreno sintetico risultava compresa tra l'80 e il 90%.

Il periodo iniziale di crescita dovuto alla presenza di ammonio nei fermentati ha determinato una bassa efficienza di conversione del substrato in H₂ (circa il 20%), mentre nel controllo con mezzo sintetico è risultata pari al 51%.

Le prime prove condotte utilizzando gli scarti del mercato ortofrutticolo hanno portato ad ottenere un fermentato contenente acido lattico 13,3 gL⁻¹, acido acetico 2,2 gL⁻¹, etanolo 3,4 gL⁻¹ e ammonio 0,38 gL⁻¹. Prove preliminari qualitative di produzione di H₂ con *R. palustris* 42OL, condotte utilizzando il substrato diluito in varie proporzioni, hanno mostrato una produzione di gas contenente H₂ in percentuale compresa tra il 60 e il 70%.

Rhodopseudomonas palustris, idrogeno, residui vegetali.

COLTURA DI MICROALGHE RICCHE IN LIPIDI COME FONTE DI BIODIESEL

L. Rodolfi¹, N. Bassi¹, N. Biondi¹, I. Parente¹, G. Padovani¹, G. Chini Zittelli², M.R. Tredici¹

¹Dipartimento di Biotecnologie Agrarie - Università degli Studi di Firenze

²Istituto per lo Studio degli Ecosistemi – CNR

Molte microalghe, specialmente di origine marina, sono naturalmente ricche in triacilgliceroli (TAG), la frazione lipidica utilizzata per la produzione di biodiesel in seguito a transesterificazione. Alcuni ceppi possono essere indotti ad iper-accumulare TAG in condizioni di stress.

Rispetto alle colture agrarie utilizzate per la produzione di biodiesel (soia, girasole, colza, palma, ecc.), le microalghe presentano una maggiore efficienza di conversione dell'energia luminosa in biomassa e conseguono produzioni in lipidi utili per l'ottenimento di biodiesel di gran lunga superiori (fino a 20 volte). Inoltre la coltura delle microalghe può essere effettuata utilizzando come mezzo di coltura acque reflue di origine agricola, industriale o domestica, e su terreni marginali, non andando quindi a competere per queste risorse con le tradizionali colture agrarie. Le microalghe vengono pertanto sempre più considerate come fonte potenziale di combustibili rinnovabili.

Nel presente studio sono stati coltivati in batch 31 ceppi di microalghe, sia marine che di acqua dolce, appartenenti a 14 generi diversi, e sono stati caratterizzati per capacità di crescita e tenore di lipidi. Due ceppi di acqua dolce (*Scenedesmus* sp. DM e *Chlorella* sp. AMI2) e due marini (*Nannochloropsis* sp. ZM e *Tetraselmis suecica* OR) sono stati testati per la loro capacità di accumulare lipidi in carenza di azoto. Le microalghe sono state coltivate in tubi insufflati da 600 ml, con regime di raccolta in semicontinuo (tasso di diluizione giornaliero del 50%). In carenza di azoto, *Chlorella* AMI2 e *Scenedesmus* DM hanno sintetizzato prevalentemente carboidrati, mentre *Tetraselmis suecica* OR e *Nannochloropsis* ZM hanno aumentato il tenore in lipidi fino al 37% (contro il 22% del controllo) e fino al 60% (contro il 30% del controllo), rispettivamente. *Nannochloropsis* ZM è stata quindi coltivata all'aperto in coltura massiva sia in colonne anulari da 115 L (Rodolfi et al., 2003) che in un "green-wall reactor" da 600 L (Tredici & Rodolfi, 2004) al fine di valutarne il potenziale come fonte di lipidi utili per la produzione di biodiesel a livello pilota.

Microalghe, biodiesel, azoto carenza, fotobioreattori

INFLUENZA DELL'ATTIVITÀ DI ALCUNI MICRORGANISMI EPIFITI SULLA QUALITÀ DELL'OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA

B.A. Zullo, G. Cioccia, G. Ciafardini

Dipartimento S.A.V.A., Facoltà di Agraria, Università degli Studi del Molise, 86100
Campobasso

L'olio extravergine di oliva deriva dalla molitura delle olive raccolte in una particolare fase della maturazione denominata "invaiaura". L'olio appena prodotto si presenta torbido per la presenza di materiale sospeso costituito da particelle solide e microgocce di acqua di vegetazione. Tuttavia dalle nostre ricerche eseguite recentemente è stato scoperto che durante la molitura delle olive molti microrganismi epifiti presenti sui frutti e sulle foglie, migrano nell'olio dove, alcuni soccombono in breve tempo, mentre altri sopravvivono moltiplicandosi nell'interno delle micelle costituite dalle microgocce di acqua di vegetazione (1-2). Tra i microrganismi epifiti, nell'olio extravergine di oliva sono stati riscontrati dei ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida wickerhamii* capaci di migliorare le caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche del prodotto, attraverso la produzione di una β -glucosidasi, attiva sul glucoside amaro dell'olio noto come oleuropeina (3). Tuttavia non tutte le forme di lieviti presenti nell'olio migliorano la qualità del prodotto durante la sua conservazione. Con la presente ricerca sono stati individuati alcuni ceppi di *Williopsis californica* e *Saccharomyces cerevisiae* produttori di lipasi, capaci di idrolizzare i trigliceridi dell'olio extravergine di oliva, durante il processo di sedimentazione del prodotto. Le prove di laboratorio hanno indicato un elevato incremento di acidità nell'olio di oliva inoculato con ceppi lipasi positivi di *W. californica* e *S. cerevisiae*, dove in due settimane di incubazione a 30°C, l'acidità è passata rispettivamente da 0,62% a 1,50 e 1,62%, superando abbondantemente il limite dello 0,8% fissato dalla normativa attuale per questa categoria commerciale di olio di oliva. Lo stesso comportamento è stato osservato anche nei campioni naturali di olio extravergine di oliva caratterizzati da una elevata presenza di lieviti lipasi positivi. Le ricerche fin qui svolte confermano i risultati acquisiti in precedenza, dimostrando che le caratteristiche qualitative di un olio extravergine di oliva dipendono non solo da alcuni parametri agronomici e tecnologici, ma anche dal tipo di microflora presente nella massa oleosa durante il periodo di sedimentazione.

Lieviti, microrganismi epifiti, olio extravergine di oliva

**EFFETTI COMBINATI DI PH E OLI ESSENZIALI SULLA GERMINAZIONE DI
SPORE DI
*ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS***

A. Bevilacqua, M.R. Corbo, M. Sinigaglia*

Dipartimento di Scienze degli Alimenti-Facoltà di Agraria
Università di Foggia, Via Napoli 25
Tel.: +39 0881 589233; fax: +39 0881 589231; e-mail: m.sinigaglia@unifg.it

Il genere *Alicyclobacillus* è stato incluso fra i microrganismi di “spoilage” emergenti per la sua capacità di alterare prodotti acidi pastorizzati. La specie *A. acidoterrestris* è stata implicata, infatti, in diversi casi di alterazione di succhi di frutta negli USA, in Gran Bretagna e in Germania. Nuove specie di *Alicyclobacillus* sono state isolate negli ultimi anni da ambienti termali, succhi di frutta, suolo ed ambienti estremi a conferma dell’ubiquitariet  del genere e della sua importanza per l’industria alimentare.

Attualmente nella nostra societ  si sta diffondendo un “consumismo verde”, che guarda con sempre maggiore attenzione a sostanze antimicrobiche naturali, a ridotto impatto sull’ambiente e sulla salute del consumatore. Tra queste sostanze gli estratti degli oli essenziali occupano un posto di primo piano.

Sulla base di questi presupposti l’obiettivo di questo lavoro   stato quello di valutare l’efficacia antimicrobica di due composti naturali ad azione antimicrobica (aldeide cinnamica e eugenolo) sulla germinazione di spore di *A. acidoterrestris*.

Per valutare gli effetti interattivi di aldeide cinnamica (0-80 ppm), eugenolo (0-160 ppm) e pH (3,5-5,5)   stato sviluppato un Central Composite Design tre variabili e cinque livelli. Come substrato   stato utilizzato il Malt Extract broth, addizionato del 12% di saccarosio. I campioni sono stati inoculati con 10^3 spore/ml di un cocktail di ceppi di *A. acidoterrestris* (c6, c8, c10 e c24, isolati da suolo; γ 4, isolato da succo di pera alterato) e incubati a 35  C per 7 giorni. Ogni giorno   stata valutata la germinazione delle spore per via spettrofotometrica (420 nm) e i dati sperimentali sono stati modellati con l’equazione di Gompertz modificata da Zwietering. I parametri cinetici ottenuti (A, μ_{max} e λ) sono stati, quindi, elaborati con una procedura di regressione multipla. In una seconda fase i risultati del CCD sono stati validati “in vivo”, utilizzando succo di mela (pH, 3,74; Aw, 0,989; 11,50  Bx).

I parametri A e μ_{max} erano influenzati dal pH e dalla concentrazione di aldeide cinnamica come termini individuali, rispettivamente positivo e negativo. La durata della fase lag, invece, era correlata significativamente alla concentrazione di aldeide cinnamica e alle interazioni negative [pH]x[aldeide cinnamica] e [pH]x[eugenolo]; in particolare la germinazione delle spore era inibita a pH 3,5 e alle massime concentrazioni dei due antimicrobici.

Le condizioni restrittive del succo di mela (pH, 3,74; Aw, 0,989), in combinazione con le sostanze attive, esercitavano un effetto inibente sulla germinazione delle spore, a tutte le concentrazioni utilizzate, per tutta la durata della sperimentazione.

Alicyclobacillus acidoterrestris, spore, oli essenziali

IL BIODETERIORAMENTO DEI POLIMERI SINTETICI COMPONENTI O CONSOLIDANTI/PROTETTIVI DELLE OPERE D'ARTE

F. Cappitelli, P. Principi, C. Sorlini

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano, francesca.cappitelli@unimi.it, tel. 02 50316721, fax 02 50316694

I polimeri sintetici e semisintetici sono costituenti di opere d'arte contemporanea, di supporti informativi moderni e vengono usati come protettivi e consolidanti di beni culturali. È solo da pochi anni che ci si è resi conto che i polimeri sintetici come quelli naturali sono soggetti a degrado chimico, fisico e biologico e possono avere durata anche solo di pochi anni. Il biodeterioramento può iniziare già durante la produzione del polimero ma può anche avvenire quando il polimero è in opera. I danni principali ad un polimero sono di solito da attribuire alla formazione su di esso di un biofilm.

Per quanto riguarda il biodeterioramento dei prodotti a base di polimeri sintetici usati nell'ambito della conservazione è stata recentemente scritta una review (Cappitelli et al., 2004). Tali studi iniziano negli anni '50 presso l'Istituto Centrale del Restauro a Roma con indagini sui polivinilacetati. La potenziale biodegradabilità di un polimero è stata di solito valutata seguendo standard internazionali, fra questi attualmente i più usati sono quelli dell'American Society for Testing and Materials (ASTM). Con queste metodiche il biodeterioramento viene accertato tramite osservazioni visive, al microscopio e con cambiamenti delle proprietà elettriche e fisiche. Questi cambiamenti di proprietà vengono però in genere evidenziati solo in stati avanzati di biodeterioramento per cui si è sentita l'esigenza di introdurre tecniche di valutazione del biodeterioramento più sofisticate in grado di evidenziare il biodeterioramento negli stadi iniziali del processo. A questo scopo diverse tecniche spettroscopiche sono state impiegate e confrontate; tra queste, la spettroscopia infrarossa a trasmissione, la spettroscopia Raman e la spettroscopia infrarossa fotoacustica (Cappitelli et al., 2005). Si è visto inoltre che anche i metodi di applicazione dei polimeri sintetici alle superfici possono avere una rilevante influenza sul biodeterioramento dei polimeri stessi (Cappitelli, 2006a).

Anche i beni documentari moderni quali i compact disc, composti da policarbonato, si sono mostrati suscettibili all'attacco fungino (Cappitelli e Sorlini, 2005). Si può citare come esempio il caso riportato da Garcia-Guinea et al. (2001), l'attacco fungino di un CD in Belize. È stato inoltre riportato in letteratura il danno a fibre sintetiche presenti nelle tute spaziale usate nelle missioni Apollo conservate presso il National Air e lo Space Museum dello United States Smithsonian Institution (Breuker et al., 2003). In entrambi i casi, il biodeterioramento è stato verificato solo tramite tecniche colturali tradizionali e osservazioni al microscopio. Il primo uso di tecniche di biologia molecolare per lo studio dei biodeteriogeni di opere d'arte contemporanea è riportato per l'opera "Futuro", 1965, del finlandese Matti Suuronen (Cappitelli et al., 2006b).

RIDUZIONE DEI CONSUMI IDRICI IN FRANTOI OLEARI CONTINUI MEDIANTE RICIRCOLO DI ACQUE DI VEGETAZIONE: VANTAGGI E LIMITI

G. Alfano, C. Belli, G. Ranalli

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Ambientali e Microbiologiche (DISTAAM), Università degli Studi del Molise, Campobasso

L'estrazione dell'olio di oliva con metodi continui (due e tre fasi) comporta l'aggiunta di quantità variabili di acqua potabile nella pasta con conseguente notevole produzione di acque di vegetazione (AV) e problemi ambientali, gestionali ed economici.

Sebbene la legge n. 574/96 consente lo spandimento controllato in campo delle AV provenienti da frantoi a ciclo continuo, che determinano condizioni critiche temporanee nei suoli in cui vengono versate, è da rilevare come la risorsa acqua assume sempre maggior importanza sociale ed economica.

Obiettivo della presente ricerca è la riduzione dei consumi idrici mediante ricircolo parziale di AV durante l'estrazione di olio vergine di oliva in impianti in continuo a tre fasi; inoltre la definizione del ricircolo ottimale, la qualità degli oli ottenuti, l'eventuale incremento del contenuto di polifenoli negli oli e la stabilità del processo in termini di resa di estrazione in olio.

La sperimentazione condotta su scala industriale (ARSSA Abruzzo e Azienda Della Fazia, CH) ha fornito risultati largamente positivi in termini di stabilità del processo, garantendo estrazione di olio da partite significative di olive. Sono stati ottenuti oli extra vergini di oliva di elevatissima qualità per valore di acidità, numero di perossidi e resistenza all'ossidazione; inoltre, dopo analisi sensoriale (panel test) sono risultati essere privi di difetti ed omogenei tra loro. Non è stato osservato alcun incremento del contenuto di polifenoli totali, ciò per una maggiore affinità di questi ultimi per la fase acquosa. Inoltre, stabilità del processo e rese di estrazione non hanno subito variazioni significative rispetto al controllo (acqua potabile, 0% di AV). Al 57% di ricircolo di AV si è evidenziata una riduzione di efficacia di estrazione con perdita di olio nei sottoprodotti. Il ricircolo di AV più favorevole risulta essere compreso tra il 20 ed il 42%. I risultati ottenuti dimostrano come la tecnologia basata sul ricircolo parziale di AV in impianti continui a tre fasi può rappresentare una soluzione tecnologica vantaggiosa in termini economici ed ambientali. Vantaggi: riduzione dei consumi di acqua di rete e conseguente diminuzione dei costi di approvvigionamento e depurazione, risparmio energetico (calorie richieste per portare l'acqua di rete a 25-28 °C), minori volumi di stoccaggio di AV, minori costi di trasporti e minor superficie agricola da reperire per lo spandimento.

Olio di oliva, Acque di vegetazione, Ricircolo, Consumi Idrici.

STUDIO DEL BIODETERIORAMENTO DELLE TERME SUBURBANE SITE PRESSO GLI SCAVI ARCHEOLOGICI DI ERCOLANO MEDIANTE METODI CULTURALI E MOLECOLARI

O. Pepe¹, L. Sannino², S. Palomba¹, G. Blaiotta¹, M. Anastasio¹, F. Villani¹

¹Dip. di Scienza degli Alimenti, Sezione di Microbiologia- Università di Napoli Federico II, Portici (NA)

²Società Italiana Biotecnologie, Portici (NA)

Introduzione

Il biodeterioramento è la perdita irreversibile di valore e/o informazioni di un'opera d'arte in seguito all'attacco di organismi viventi. Il complesso delle Terme Suburbane fu edificato ad Ercolano agli inizi del I sec. d. C. ed è uno dei più significativi complessi termali costituito da un ampio portale, da cui si accede ad un vestibolo che porta ai diversi ambienti quali *impluvium*, *praefurnium*, *frigidarium*, *tepidarium* e *caldarium*, anticamente adibiti alle cure termali. Al fine di un piano mirato di restauro e conservazione delle Terme Suburbane degli scavi archeologici di Ercolano, erano studiati la contaminazione microbica e i microorganismi potenzialmente responsabili del biodeterioramento.

Materiali e metodi

Per valutare il grado di contaminazione microbica si procedeva al prelievo superficiale, mediante membrane di nitrocellulosa o tamponi sterili, e diretto, mediante asportazione della parte deteriorata con spatole e pennelli sterili. Successivamente, substrati di crescita solidi erano inoculati direttamente con le membrane di nitrocellulosa o indirettamente mediante diluizioni-sospensioni delle stesse in soluzione fisiologica. I prelievi diretti erano eseguiti in presenza di superfici molto deteriorate, di biofilm o patine microbiche. I conteggi microbici erano espressi come Indice di Adesione Microbica (AM). Sia gli isolati che le patine microbiche erano sottoposti ad identificazione fenotipica e genotipica. Quest'ultima era effettuata amplificando il 16S-rDNA eubatterico e sequenziando poi una regione parziale. I campioni "tal quali", prelevati con i metodi dei tamponi e del prelievo diretto, erano inoltre sottoposti ad analisi DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) per evidenziarne la biodiversità ed eventualmente identificare specie non coltivabili.

Risultati e conclusioni

In tutte le stanze delle Terme Suburbane, la carica batterica totale, i funghi e i lieviti presentavano un valore dell'indice AM compreso tra 0,05 e 0,40 UFC/cm². Non era rilevata contaminazione da parte degli attinomiceti. L'identificazione molecolare degli isolati microbici ottenuti dall'inoculo diretto e dalle membrane, permetteva di rilevare la presenza di forme bastoncellari sporigene, appartenenti al genere *Bacillus*. Dai prelievi diretti, invece, erano isolate diverse specie microbiche di forma bastoncellare, sporigene e asporigene, ascrivibili ai generi *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*. Dall'analisi DGGE dei prelievi diretti era possibile rilevare specie appartenenti ai generi *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* e *Exiguobacterium*. Le tecniche molecolari hanno quindi evidenziato la presenza di specie non coltivabili ed una biodiversità non rilevabile con le tecniche colturali classiche.

Scavi archeologici, biodeterioramento, identificazione microbiologica, DGGE.

STUDIO DELLA GERMINAZIONE DELLE SPORE DI CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM

F. Cappa^{1,2}, P. S. Cocconcelli^{1,2}

¹ Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy,

² Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Cremona, Italy.

Il *Clostridium tyrobutyricum* è un microrganismo sporigeno che rappresenta uno dei maggiori problemi per la produzione del formaggio poiché è responsabile del difetto del gonfiore tardivo durante la maturazione del formaggio. L'obiettivo di questo studio è quello di comprendere meglio i meccanismi che permettono alle spore di interrompere la fase di dormienza passando attraverso lo stadio della germinazione fino ad arrivare alla crescita in forma di cellula vegetativa. La comprensione di questi meccanismi è indispensabile per migliorare le tecniche di controllo per evitare la germinazione e crescita delle spore in formaggio. Nella prima parte della ricerca le spore di *C. tyrobutyricum* sono state studiate tramite la valutazione della diminuzione della densità ottica utilizzando differenti tamponi. Questi tamponi addizionati con aminoacidi e lisozima e terreni preconditionati, sono stati utilizzati per indurre la germinazione delle spore per individuare le molecole "germinanti" che accendono il processo. L'alto tasso di germinazione è stato osservato quando le spore sono state messe in presenza di aminoacidi ed acido lattico e si è notato essere di rilevante importanza l'effetto sinergico con il pH. Lo studio del processo di germinazione è stato inoltre affrontato tramite una nuova tecnica di Microscopia elettronica a scansione (SEM) associata alla tecnica della microanalisi che è stata utilizzata per monitorare la germinazione tramite i cambiamenti morfologici ed allo stesso tempo è stato valutato il rilascio di Ca^{2+} dall'acido dipicolinico dalle spore. Inoltre sono state estratte le proteine della parete cellulare dalle cellule vegetative e dalle spore mature ed i profili elettroforetici SDS-PAGE sono stati comparati per individuare la sintesi di nuove proteine durante il processo di germinazione. Altresì sono stati eseguiti degli zimogrammi per individuare gli enzimi coinvolti nella lisi del coat della spora matura e si è notato un rilevante effetto sinergico con il pH.

Clostridium tyrobutyricum, spore, germinazione, interazioni microbiche

STUDIO QUANTITATIVO DI BIOFILM MICROBICI

B. Speranza, C. Altieri*, M. Sinigaglia

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Facoltà di Agraria
Università degli Studi di Foggia, Via Napoli, 25
Tel.: +39 0881 589235; fax: +39 0881 589231; e-mail: c.altieri@unifg.it

Il biofilm microbico rappresenta un sistema biologico costituito da un'associazione di microrganismi adesi ad una superficie ed intrappolati all'interno di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) da essi stessi prodotte. Generalmente le cellule sessili sono vitali ma non sempre coltivabili; tale condizione deriva dal fatto che i batteri intrappolati all'interno di biofilm, specialmente se questi sono formati su superfici di impianti industriali, sono soggetti a diversi stress (carenza di nutrienti, azione di composti chimici, shock termico, etc.) che danneggiano le cellule, rendendole "difficilmente coltivabili" e causando particolari difficoltà nelle analisi quali-quantitative. Negli ultimi anni ai metodi convenzionalmente usati per l'enumerazione delle cellule sessili si stanno affiancando metodi di conta diretta al microscopio e, in alcuni casi, metodi che utilizzano la microscopia ad epifluorescenza.

Sulla base di questi presupposti, il presente lavoro si è proposto l'obiettivo di mettere a confronto diverse tecniche per l'analisi quantitativa di cellule vitali in una sospensione e in un biofilm microbico. Nel dettaglio il confronto è stato effettuato tra la conta diretta in piastra e la conta diretta al microscopio ad epifluorescenza, con l'uso di tre diversi fluorocromi selettivi: il 4,6-Diamino-2-fenilindolo (DAPI), il 3,6-bis-Dimethylamino-acridina (Arancio di acridina) e il 5-Ciano-2,3-di-(p-tolil) tetrazolio cloruro (CTC). Nella sperimentazione è stato utilizzato il ceppo di *Salmonella* spp. (ATCC 35664) e l'efficacia delle tecniche messe a confronto è stata valutata attraverso un'analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal Test di Tukey ($P < 0,05$).

Relativamente alla determinazione del numero di cellule in forma planctonica, la conta diretta in piastra si è mostrato il metodo più preciso; nonostante i limiti intrinseci di tale tecnica, essa ha consentito di trarre le migliori informazioni rispetto alla quantità di cellule vitali presenti nel sistema studiato, confermandosi il metodo più adatto per contare il numero di cellule vitali in sospensione.

D'altro canto, indipendentemente dal fluorocromo utilizzato, i metodi di conta diretta al microscopio ad epifluorescenza si sono mostrati molto efficaci nella determinazione quantitativa delle cellule di un biofilm presentando alcuni importanti vantaggi: rapidità e facilità di esecuzione, possibilità di distinguere le cellule vive dalle cellule morte, possibilità di contare le cellule *in situ*.

Inoltre il CTC, che fino a questo momento non ha trovato applicazione in batteriologia, si è rivelato un fluorocromo molto efficace nella determinazione quantitativa di cellule metabolicamente attive (dal punto di vista della respirazione) in un biofilm.

Biofilm, cellule vitali non coltivabili, epifluorescenza

DETERMINAZIONE DI MUFFE MICOTOSSIGENE IN GRANO DELLA PROVINCIA TERAMANA

R. Tofalo, C. Chaves-López, M. Schirone, A. Serio, G. Suzzi

Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Teramo - Via C.R. Lerici, 1
- 64023 Mosciano S. Angelo (TE), Italy.

Tra i tricotriceni prodotti da *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* e *F. poae*, il deossilvalenolo (DON) è la micotossina che più spesso viene rilevata nei cereali in Europa. L'ingestione di tale tossina è un potenziale rischio per la salute dell'uomo e degli animali, dando effetti epato-nefrotossici.

Per determinare la presenza di DON nella produzione cerealicola abruzzese, sono stati presi in esame 32 campioni di grano provenienti dalle diverse aree regionali e ne è stato determinato il contenuto. Parallelamente sono state eseguite isolamenti di muffe per verificare la presenza di ceppi micotossigeni. L'analisi di DON, mediante HPLC, ha consentito di rilevare la tossina in tutti i campioni analizzati: i valori erano compresi tra 1.38ppm e 5.9ppm. In particolare, l'84% dei campioni in esame presentava valori al di sopra del limite consentito dalla legge (1.75ppm). Mediante analisi sia morfologiche che molecolari, 227 muffe sono state identificate; le più rappresentate erano *Alternaria* (32%), *Fusarium* (22%), *Penicillium* (18%) ed *Aspergillus* (12%). La conferma della specie è stata determinata mediante sequenziamento della regione 26S, in particolare del dominio D1/D2. Le specie maggiormente presenti erano *F. proliferatum* (46%) e *A. tenuissima* (15%). La RAPD-PCR ha permesso di evidenziare un certa biodiversità nell'ambito delle specie esaminate. La ricerca del gene *Tri 5*, responsabile della sintesi di DON, determinato tramite Real-time-PCR ha dato risultati negativi nei ceppi esaminati. Al contrario il gene in esame è stato ritrovato in tutti i campioni di grano, dimostrando l'avvenuta crescita di una specie micotossigena in una qualche fase della produzione. La concentrazione di DON è stata quindi correlata con la quantità del gene *Tri5* DNA.

Micotossine, DON, *Fusarium*, Real-time-PCR

VALUTAZIONE DEL RISCHIO: ENTEROCOCCHI E STAFILOCOCCI ALIMENTARI

S. Gazzola¹, C. Fontana^{2,3}, P. S. Cocconcelli^{1,2}

¹ Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy, ² Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Cremona, Italy, ³ CERELA, CONICET, Tucuman, Argentina

Nell'ambito della sicurezza alimentare gli enterococchi e gli stafilococchi sono da tempo al centro dell'attenzione in quanto se da un lato rappresentano i principali microrganismi della microflora di alcuni alimenti fermentati dall'altro sono altresì coinvolti in infezioni nosocomiali.

In questo studio è stata effettuata una valutazione del rischio relativo al consumo di alimenti fermentati con particolare attenzione a questi due generi batterici isolati da questo tipo di alimenti. Si è in un primo tempo identificato e caratterizzato il rischio valutando la presenza di fattori di virulenza ed antibiotico resistenza nei ceppi di enterococchi e stafilococchi coagulasi negativi (CNS) isolati. Sono state effettuate le MIC per gli antibiotici più rilevanti dal punto di vista clinico seguendo le linee guida NCCLS mentre la tecnica di PCR ha permesso di identificare i geni codificanti differenti fattori di virulenza e quelli coinvolti nella resistenza agli antibiotici.

I geni coinvolti nell'antibiotico resistenza sono stati ritrovati con elevata frequenza in entrambi i generi microbici mentre si è osservata una notevole differenza nella diffusione dei geni codificanti i fattori di virulenza. I geni responsabili delle enterotossine sono stati ritrovati con una bassa frequenza tra gli stafilococchi isolati. I geni coinvolti nella patogenicità degli enterococchi sembrano avere una diversa distribuzione nell'ambito della specie infatti sono stati ritrovati con maggior frequenza in *E. faecalis*, come già riportato in bibliografia, e in *E. casseliflavus* mentre con bassa frequenza in *E. faecium*.

Successivamente è stata effettuata la valutazione dell'esposizione al rischio della crescita di enterococchi e stafilococchi (CNS) monitorando la loro cinetica di inattivazione e la dinamica di crescita durante il processo di produzione. Nel presente studio si è osservato un incremento di questi microrganismi durante il processo di stagionatura come nella maggior parte dei prodotti fermentati.

[Analisi del rischio, alimenti fermentati, enterococchi, stafilococchi](#)

BIFIDOBATTERI PROBIOTICI IN SUINI IN SVEZZAMENTO QUALE BARRIERA ALLA COLONIZZAZIONE DI PATOGENI ENTERICI

M. Modesto, I. Stefanini, M.R. D'Aimmo, M. Mazzoni, P. Trevisi, C. Tittarelli, P. Bosi, B. Biavati

Il periodo dello svezzamento costituisce un momento di grande vulnerabilità per i suini: lo stress indotto dalla modificazione della dieta induce alterazioni della microflora intestinale che si traducono in una maggiore predisposizione a disordini ed infezioni gastrointestinali. Patogeni enterici sono spesso causa per gli allevamenti di forte mortalità.

Il bando all'uso degli antibiotici con l'unica funzione di promotori della crescita e la richiesta di carni sicure, incrementa il ricorso ai probiotici come alternativa profilattica per migliorare le performance degli animali da reddito.

I probiotici, grazie alla produzione di acidi organici (lattico, acetico e formico) riducono il pH dell'intestino e mantengono un normale equilibrio della microflora intestinale.

La loro abilità nell'aderire agli enterociti ne impedisce inoltre l'adesione ai patogeni enterici: è nota infatti la capacità di alcuni probiotici di agire nei confronti dei batteri patogeni per esclusione competitiva e/o per attività antagonista.

Uno studio in vivo, è stato condotto allo scopo di valutare, l'effetto probiotico di *B. animalis subsp. lactis*, ceppo RA 18, rispetto all'antibiotico Gentamicina (60g/100 Kg di alimento) contro *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, in un challenge test su 32 suini in svezzamento.

Le analisi quantitative sul contenuto di ceco, e la ricerca qualitativa della *Salmonella* in campioni fecali e tessuto dei linfonodi, mostrano che il ceppo Ra 18 esercita capacità probiotiche sulla microflora intestinale dei soggetti trattati: promuove il livello di bifidobatteri cecali, che si moltiplicano e colonizzano anche in presenza di *Salmonella*, favorisce l'aumento di peso degli animali, riduce la frequenza di diarrea ed il numero di soggetti positivi, nelle feci, al patogeno.

L'antibiotico non interagisce con il livello di bifidobatteri probiotici nel ceco, tuttavia, diminuisce il numero di soggetti positivi al patogeno nei linfonodi.

Probiotici, Effetto barriera, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*.

Ringraziamenti: Si ringrazia la Comunità Europea per il Finanziamento al Progetto "Quality low input Food"

RICERCA E SELEZIONE DI MICRORGANISMI PROBIOTICI DESTINATI ALL'APICOLTURA

F. Canganella^{1,2}, R. Balsamo¹, E. Di Mattia^{1,2}

¹Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, e ²Gruppo di Ricerca in EsoAgroBiologia, Università della Tuscia, Viterbo

In questo lavoro sono stati utilizzati campioni di api, miele e covata provenienti da un aviario sperimentale sito nel comune di Caprarola (VT). Con questi campioni sono state approntate delle colture di arricchimento che hanno portato in seguito all'isolamento di 45 ceppi rappresentativi della microflora presente nell'ecosistema oggetto di studio. Attraverso indagini fisiologiche (velocità di crescita, tolleranza a basso pH) e tassonomiche (sistema BIOLOG) sono stati selezionati 6 ceppi con potenzialità probiotiche che sono stati poi esaminati in vitro per valutare la loro attività antagonista verso *Paenibacillus larvae* e *Paenibacillus alvei*.

Alcuni di questi ceppi hanno mostrato capacità inibente nei riguardi dei due batteri antagonisti e dunque potrebbero rappresentare degli interessanti candidati per la lotta biologica verso questi patogeni. In seguito a questo risultato ulteriori prove sperimentali sono state condotte per valutare la sopravvivenza dei ceppi probiotici selezionati alla crio-liofilizzazione, sia a temperature diverse che in presenza di diversi agenti crioprotettivi. Sulla base dei risultati ottenuti è auspicabile, sia per motivi strettamente ecologici che per un discorso tassonomico e potenzialmente applicativo, che si possano approfondire in futuro gli aspetti strettamente microbiologici legati alle applicazioni in vivo dei batteri probiotici nel settore dell'apicoltura. Ciò favorirà non solo lo sviluppo delle nostre conoscenze microbiologiche di base ma potrà permettere di sviluppare nuovi approcci biologici per salvaguardare la salute delle api e per migliorare la qualità del miele prodotto.

Apicoltura, microrganismi, probiotici

L'ATTIVITÀ β -GLUCANASICA È COINVOLTA NELL'AZIONE ANTIMICROBICA DELLA TOSSINA KILLER DI *KLUYVEROMYCES PHAFFII*

F. Comitini, I. Mannazzu, M. Ciani

Dipartimento Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche

Via Brece Bianche 60131 Ancona; e-mail: gruppo.ciani@univpm.it

Le tossine killer sono molecole per la maggior parte di natura proteica o glicoproteica, prodotte e secrete da alcuni ceppi di lievito in grado di provocare la morte di altri ceppi appartenenti allo stessa specie e/o a specie e generi diversi. *Kluyveromyces phaffii* produce una tossina killer (Kpkt) di natura glicoproteica con azione intergenerica, in grado cioè di inibire lo sviluppo anche di lieviti appartenenti al genere *Hanseniaspora*, definiti in campo enologico “lieviti selvaggi”.

Con lo scopo di impiegare Kpkt per regolare i processi microbiologici durante la fermentazione, in combinazione o in alternativa alla anidride solforosa, è stata avviata la caratterizzazione di tale principio attivo.

I risultati ottenuti hanno riguardato lo studio del meccanismo d'azione di Kpkt nei confronti del lievito sensibile e la valutazione di un suo possibile impiego diretto in vinificazione.

Dopo aver purificato Kpkt mediante tecniche cromatografiche la proteina è stata trasferita su membrana PVDF mediante elettro-blotting e sottoposta a sequenziamento.

La analisi BLAST dei primi 15 AA sequenziati non ha rilevato omologie con alcuna delle tossine killer a sequenza nota depositate in banca dati. Tuttavia, la regione N-terminale di Kpkt mostrava il 93% di identità e il 100% di similarità con una β -1,3-glucanasi di *S. cerevisiae* e l'80% di identità e il 100% di similarità con una β -1,3-glucantransferasi di *C. albicans*.

Tale similarità ci ha indotto a valutare una eventuale attività enzimatica associata alla tossina.

I risultati di tali prove hanno indicato che Kpkt mostra un'attività glucanasica confrontabile con quella di una laminarinasi commerciale utilizzata come controllo positivo.

Per valutare la possibile relazione esistente tra attività killer e attività β -glucanasica, la ricerca è proseguita utilizzando specifici inibitori dell'attività enzimatica di Kpkt. Si è così osservato che la castanospermina, un inibitore specifico delle β -glucanasi, oltre ad inibire l'attività enzimatica di Kpkt inibisce anche la attività killer.

Il coinvolgimento dell'attività enzimatica nell'azione killer è stato inoltre confermato in saggi fluorimetrici utilizzando come fluorocromo il calcofluor che si lega selettivamente alla chitina permettendo così di valutare l'azione della tossina a livello di parete.

Tossine killer; *Kluyveromyces phaffii*; attività β -glucanasica; castanospermina, calcofluor.

ATTIVITÀ INIBENTE LA CRESCITA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* DA PARTE DI CEPPI DI BIFIDOBATTERI

R. Gasbarri¹, F. Gaggia¹, Bruno Biavati¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Facoltà di Agraria, Bologna, Italia

Campylobacter jejuni è un microrganismo gram-negativo, patogeno emergente, causa di frequenti infezioni del tratto gastro-intestinale nell'uomo spesso associate al consumo di carne di pollame cotta poco e/o in modo inadeguato e alla sua erronea manipolazione. I bifidobatteri sono naturali colonizzatori del tratto gastro-intestinale dell'uomo e numerosi studi hanno evidenziato gli effetti benefici di tali microrganismi sull'equilibrio microbico intestinale, essendo in grado di prevenire la colonizzazione di microrganismi patogeni. Scopo di questo lavoro è stata la ricerca dell'attività antimicrobica di 33 ceppi di bifidobatteri, provenienti da differenti habitat, verso tre ceppi di *C. jejuni* (CIP 70.2, LMG 8842, 221/05) per la loro possibile applicazione come probiotici in campo animale. Gli esperimenti sono stati effettuati *in vitro* utilizzando la tecnica "spot agar assay" testando sia l'attività delle cellule, sia l'attività del surnatante (filtrato e tamponato). Dall'attività delle cellule è stata ottenuta la più alta percentuale di inibizione: 39% contro CIP 70.2, 21% contro LMG 8842, 9% contro 221/05. Mediante il test effettuato con il surnatante, un solo ceppo ha mostrato una lieve attività di inibizione contro il *C. jejuni* CIP 70.2. Nel primo caso, l'attività antimicrobica potrebbe essere dovuta alla produzione di acidi organici con conseguente abbassamento del pH del terreno. Nel secondo caso il test con il supernatante filtrato e tamponato, escludendo l'inibizione da acidità, mette in evidenza la possibile presenza di molecole di natura proteica (tipo batteriocine) con attività inibitoria; la debole inibizione da parte di un solo ceppo osservata potrebbe essere dovuta ad una bassa concentrazione di tali molecole nel surnatante analizzato. I risultati del lavoro per quanto riguarda la competizione cellula-cellula hanno mostrato da parte dei bifidobatteri una buona attività inibente la crescita di *C. jejuni* e tale attività è risultata essere ceppo-specifica e non specie-specifica. Inoltre, studi più approfonditi sul surnatante sono necessari per ricercare la presenza e l'attività di molecole con potenzialità antimicrobiche.

Bifidobatteri, probiotico, spot agar assay.

Ringraziamenti: Si ringrazia la Comunità Europea per il supporto finanziario al progetto europeo "Pathogen Combat"

DIVERSITÀ E ASPETTI DI SICUREZZA DI ENTEROCOCCHI ISOLATI DA PECORINO ABRUZZESE

A. Serio, C. Chaves López, G. Suzzi, A. Paparella

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo, via C.R. Lericci 1, 64023 Mosciano Stazione (TE)

Gli enterococchi sono microrganismi comunemente riscontrati nei formaggi dell'area Mediterranea, soprattutto di origine ovina, in cui rivestono un ruolo importante per lo sviluppo delle caratteristiche sensoriali del prodotto mediante le loro attività metaboliche su proteine, lipidi e citrato. D'altra parte, essi sono patogeni opportunisti, spesso sono coinvolti in infezioni nosocomiali come endocarditi e batteremia. Inoltre sono in grado di sviluppare caratteri di resistenza ad antibiotici, facilmente trasmissibili ad altri batteri. Questo studio è stato incentrato sulla popolazione di enterococchi del Pecorino Abruzzese, un formaggio ovino artigianale tradizionalmente prodotto in Abruzzo. Settanta isolati sono stati identificati e caratterizzati per via genotipica e sono state valutate alcune caratteristiche di virulenza. I ceppi sono risultati appartenenti alle specie *Enterococcus faecium* (48.5%) e *E. faecalis* (40%) e, in misura minore, ad *E. durans* (11.5%). La RAPD-PCR mediante i primers M13 e D 8635 ha consentito di raggruppare gli isolati secondo la specie evidenziando una discreta biodiversità intra-specifica, soprattutto per *E. faecium*. E' stata quindi valutata la presenza dei geni codificanti per alcuni fattori di virulenza, tra i quali i più comuni sono risultati quelli per la gelatinasi (gel) e il fattore di aggregazione (asa1), posseduti dal 35.7% degli *E. faecalis*. Tuttavia nessuno dei ceppi ha prodotto gelatinasi in vitro, rivelando la presenza di geni silenti già descritti da altri autori. Nessuno tra gli isolati della specie *E. durans* presentava caratteri di virulenza. Ad eccezione di un unico ceppo positivo a gel e asa 1, anche gli *E. faecium* non possedevano fattori di virulenza, ma mostravano una resistenza agli antibiotici maggiore di *E. faecalis* ed *E. durans*. In particolare, è risultata molto comune la resistenza all'eritromicina (75.7% *E. faecium*), mentre tutti gli isolati erano suscettibili alla vancomicina, dato confermato anche dall'assenza dei geni *Van A* e *Van B* codificanti per la resistenza a questo antibiotico, valutata mediante PCR. Scarsa è risultata la resistenza ad antibiotici di rilevanza clinica, come ampicillina (3% *E. faecium*), streptomina (3% *E. faecium*) e gentamicina (12.2% *E. faecium* e 6.9% *E. faecalis*). La valutazione dell'attività decarbossilasica su sei aminoacidi ha consentito di determinare che il 27% dei ceppi era in grado di decarbossilare la fenilalanina e il 96% la tirosina, con produzione di tiramina. Nessuno degli isolati ha mostrato invece attività nei confronti dell'istidina.

Enterococchi, virulenza, antibiotico-resistenza, biodiversità

ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DI ACIDI GRASSI E RELATIVI MONOGLICERIDI

D. Cardillo¹, A. Bevilacqua, C. Altieri^{*2}, M. Sinigaglia

¹ Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Facoltà di Agraria
Università degli Studi di Foggia, Via Napoli, 25

^{*2} Dipartimento di Scienze degli Alimenti – Facoltà di Agraria
Università degli Studi di Foggia, Via Napoli 25, 71100 Foggia, Italia
Tel: 0881-589235; fax: 0881-589231; e-mail: c.altieri@unifg.it

Negli ultimi anni, nei Paesi Occidentali è cresciuta in maniera esponenziale la richiesta di alimenti salubri e naturali, privi di additivi chimici (Burt, 2004). Per questo, in campo alimentare la ricerca ha focalizzato la sua attenzione sull'individuazione di sostanze naturali ad attività antimicrobica, facilmente reperibili in natura, non tossiche, economiche e biodegradabili, in grado quindi di inibire lo sviluppo di microrganismi degradativi e/o patogeni, senza alterare le caratteristiche di freschezza e di genuinità del prodotto.

Tra i composti naturali più promettenti possiamo annoverare, oltre agli oli essenziali (Burt, 2004), gli acidi grassi e relativi monogliceridi.

L'attività antimicrobica degli acidi grassi e dei loro monogliceridi nei confronti di batteri patogeni è ampiamente documentata dalla letteratura scientifica; non esistono, tuttavia, studi sulla bioattività di queste molecole nei confronti delle muffe.

Le specie isolate più frequentemente dagli alimenti appartengono ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* e *Fusarium*. Lo sviluppo di muffe causa un deprezzamento della qualità globale del prodotto alimentare; inoltre, molti dei ceppi isolati sono notoriamente produttori di micotossine.

Sulla base di quanto detto l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'attività antimicrobica di tre acidi grassi (acidi laurico, miristico e palmitico) e dei relativi monogliceridi (monolaurina, acido monomiristico e palmitina) nei confronti di muffe tossinogene e non tossinogene, contaminanti le derrate alimentari e molto diffusi nell'ambiente, al fine di proporre delle alternative ai tradizionali antifungini aggiunti agli alimenti.

I risultati ottenuti sono promettenti; in particolare l'attività antimicrobica non sembra influenzata dall'esterificazione della molecola, almeno per gli acidi miristico e palmitico. Solo nel caso dell'acido laurico l'esterificazione con il glicerolo potenziava drasticamente la bioattività della molecola, soprattutto alle più alte concentrazioni.

Inoltre l'efficacia antimicrobica appare ceppo-dipendente.

Da un punto di vista applicativo gli acidi grassi appaiono degli antifungini promettenti, soprattutto perché hanno inibito lo sviluppo fungino a concentrazioni relativamente basse, sicuramente non tossiche per l'uomo, anche se risulta indispensabile validare i risultati in sistemi reali, individuando le condizioni operative ottimali, che esaltano la bioattività delle molecole, senza influire sulle caratteristiche organolettiche dell'alimento.

Acidi grassi, muffe, bioattività.

ANTIBIOTICO RESISTENZE IN *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*.

G. Berruti, L. Tosi e L. Morelli

Università Cattolica del Sacro Cuore-Istituto di Microbiologia. Via Emilia Parmense 84,
29100 Piacenza

Negli ultimi decenni l'utilizzo degli antibiotici a scopo terapeutico o come promotori della crescita nell'allevamento animale ha portato alla comparsa e alla diffusione di microrganismi resistenti. Tale fenomeno costituisce una preoccupante minaccia per la salute umana, in quanto i geni per l'antibiotico resistenza (AR) sono ritrovati sempre più spesso anche in batteri normalmente associati a prodotti alimentari.

In questo contesto, batteri resistenti del genere *Streptococcus thermophilus* possono non rappresentare di per sé un rischio clinico, ma essere invece veicolo di geni codificanti l'antibiotico-resistenza verso batteri patogeni o potenzialmente tali che risulterebbero di difficile controllo con i farmaci tradizionali. E' stata segnalata la presenza di tali geni in molti batteri lattici (LAB), microrganismi ubiquitari largamente utilizzati in diversi settori dell'industria alimentare.

Da queste motivazioni nasce l'interesse per lo studio dell'influenza dell'uso di antibiotici sulle comunità microbiche di batteri lattici normalmente utilizzati nelle filiere alimentari.

Obiettivo di questo lavoro è stato quindi valutare la diffusione di AR in differenti ceppi di *S. thermophilus* isolati tra il 1947 e il 2004 da produzioni lattiero-casearie. A tale scopo è stata impiegata la tecnica dei microarrays a DNA utilizzando oligonucleotidi da 50 e 60-mer, per un totale di 300, appartenenti a 8 classi diverse di antibiotici. La conferma dei risultati è stata ottenuta mediante PCR, mentre l'espressione fenotipica è stata valutata con il metodo delle microdiluizioni in brodo, in accordo con gli standard NCCLS, per la determinazione delle MICs (Minimum Inhibitory Concentration).

In 9 ceppi di *S. thermophilus* è stato possibile mettere in evidenza la presenza di almeno uno dei geni tetS, ermB e mefA, responsabili rispettivamente della resistenza agli antibiotici Tetraciclina e Eritromicina.

La messa a punto di un sistema microarray a DNA come quello presentato in questo lavoro, potrà essere utilizzato per ottenere un completo profilo dei geni codificanti per l'AR e quindi utilizzato per una valutazione della biosicurezza dei LAB, normalmente impiegati in applicazioni alimentari sia ad uso umano che animale, in quanto, nell'ambito della Comunità Europea, l'assenza di determinanti genetiche deve essere dimostrata.

Streptococcus thermophilus, DNA microarray, sicurezza alimentare, antibiotico resistenza.

STUDI PRELIMINARI SULLA SERINA-PROTEASI Pr1 NEL FUNGO ENTOMOPATOGENO *BEAUVERIA BRONGNIARTII*.

P. Dolci*, O.I. Ozino*

*DIVAPRA, Microbiologia e Industrie agrarie, Università degli Studi di Torino

I funghi entomopatogeni penetrano attraverso la cuticola dell'insetto grazie ad azioni proteolitiche e chitinolitiche, che sono quindi importanti fattori di patogenicità. Uno dei più studiati è la serina-proteasi Pr1, isolata e caratterizzata nei funghi entomopatogeni *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

In questo lavoro sono riportate le prime acquisizioni relative alla caratterizzazione di tale enzima in *B. brongniartii*, micete entomopatogeno che presenta come insetti ospiti, oltre al fitofago *Melolontha melolontha*, un ristretto numero di Coleotteri terricoli. Sulla base del confronto delle sequenze aminoacidiche e nucleotidiche di Pr1 in *B. bassiana* e *M. anisopliae* sono state disegnate due coppie di primer per l'amplificazione, mediante nested-PCR, di una parte del gene Pr1 in *B. brongniartii*. L'amplificato ottenuto dalla seconda reazione nested-PCR è stato clonato, sequenziato e quindi sottoposto a restrizione enzimatica con Taq I, Rsa I e Msp I.

Parallelamente sono stati eseguiti saggi enzimatici al fine di:

1. valutare e confrontare l'attività di Pr1 nei funghi entomopatogeni *B. brongniartii*, *B. bassiana* e *M. anisopliae* in risposta ai substrati Minimal Medium, Minimal Medium arricchito di cuticola dell'insetto ospite *M. melolontha* e Minimal Medium arricchito di cuticola dell'insetto non ospite *Blaberus discoidalis*.
2. valutare l'attività enzimatica di Pr1 in *B. brongniartii* in presenza di concentrazioni crescenti di cuticola dell'insetto ospite *M. melolontha*.

L'attività enzimatica di Pr1 è stata determinata mediante registrazione, con Lab System Microplate Reader, del rilascio di p-nitroanilina. È stato osservato, in *B. brongniartii*, un aumento dell'attività di Pr1 in risposta alla presenza, nel substrato, di concentrazioni crescenti della cuticola di *M. melolontha*; al contrario *B. bassiana* e *M. anisopliae*, funghi entomopatogeni a più ampio spettro d'azione, hanno espresso la proteasi in presenza di mezzo arricchito sia con cuticola di *M. melolontha* che di *B. discoidalis*.

Questi primi risultati, insieme all'assenza di polimorfismo rilevata in *B. brongniartii* a livello della porzione sequenziata del gene Pr1, permettono di ipotizzare che questo enzima, oltre ad avere un ruolo fondamentale nel processo infettivo, potrebbe essere uno dei fattori determinanti la specificità d'azione di *B. brongniartii* nei confronti di un ristretto numero di insetti ospiti. Questa ipotesi è avvalorata dalla presenza invece di polimorfismo a livello della sequenza codificante Pr1 in funghi entomopatogeni a più ampio spettro d'azione quali *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

Pr1, *Beauveria brongniartii*, funghi entomopatogeni

PURIFICAZIONE, SEQUENZIAMENTO E MECCANISMO DI AZIONE DI PIKT, UNA TOSSINA KILLER CON POTENZIALI APPLICAZIONI NELLA INDUSTRIA ENOLOGICA

J. De Ingeniis^{1,2}, N. Raffaelli², M. Ciani¹, I. Mannazzu¹

¹Dipartimento di Scienze degli Alimenti, ²Istituto di Biotecnologie Biochimiche, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona.

Le tossine prodotte dai lieviti killer sono estremamente interessanti da un punto di vista biotecnologico per le loro potenziali applicazioni come antimicrobici naturali nell'industria alimentare (Lowes *et al.*, 2000) e in campo medico per combattere infezioni fungine (Seguy *et al.*, 1998; Conti *et al.*, 2002). Una di queste, Pikt (*Pichia anomala* killer toxin), esplica azione letale su lieviti appartenenti al genere *Brettanomyces/Dekkera* e ha possibili applicazioni nell'industria enologica. Per tale motivo nei nostri laboratori si è proceduto con la purificazione e il sequenziamento della porzione N-terminale della tossina e con lo studio del suo meccanismo di azione sulle cellule dei lieviti sensibili. La purificazione della tossina ha richiesto due step cromatografici: una cromatografia a scambio anionico (DEAE), seguita da una cromatografia a scambio cationico (S-cation). Con la procedura di purificazione si è ottenuta una preparazione omogenea, come dimostrato dall'SDS-PAGE che rivela una singola banda proteica di circa 8 kDa. La sequenza dei primi 10 residui di Pikt ha mostrato completa identità con la sequenza dell'ubiquitina e/o di proteine simili all'ubiquitina (ubiquitin-like protein) (Kieffer A.E. *et al.*, 2003; Ng T.B. *et al.*, 2002; Wang H.X. *et al.*, 2003). Il saggio di inibizione competitiva esercitata dai componenti della parete cellulare sull'attività di Pikt ha indicato che i pustulani (β -1,6-glucani) costituiscono il sito recettoriale primario della tossina sulla parete cellulare del ceppo sensibile. L'effetto della tossina sulla progressione del ciclo cellulare del ceppo sensibile è attualmente oggetto di studio.

AZIONE DEI LIEVITI NELL'ABBATTIMENTO DELL' OCRATOSSINA A DURANTE LA FERMENTAZIONE VINARIA

¹P. Vignozzi, ²L. Lencioni, ³S. Tegli, ²P. Domizio, ¹M.C. Pozo.

¹Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione Patologia Vegetale, Laboratorio di Patologia Vegetale Molecolare, Università degli studi di Firenze, Via della Lastruccia 10, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italia.

²Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione Tecnologie Alimentari, Università degli studi di Firenze, Via Donizetti 6, 50144 Firenze, Italia.

E-mail: lencioni@unifi.it

Sebbene le operazioni di vinificazione consentano solo una parziale riduzione dell'Ocratossina A (OTA), le fermentazioni alcolica e malolattica sono tuttavia uno strumento importante per operare una detossificazione "biologica" da parte dei lieviti e batteri comunque presenti, attraverso meccanismi non ancora elucidati e che potrebbero coinvolgere fenomeni di assorbimento, adsorbimento e/o di idrolisi enzimatica della tossina. Gli studi fin ora effettuati hanno evidenziato una differente capacità di abbattimento dell'OTA nel vino da parte dei diversi ceppi di lievito, con riduzioni che vanno dallo 0 fino a oltre il 50% dell'OTA presente.

Il lavoro riporta i risultati preliminari di una sperimentazione tesa ad elucidare il possibile meccanismo di abbattimento dell'OTA durante la fermentazione ad opera dei lieviti vinari. Per le prove sono stati utilizzati oltre a un ceppo commerciale anche due mutanti di *Saccharomyces*, alterati nella capacità relativa alla compartimentazione vacuolare della carbossipeptidasi Y (CPY), e quindi alto secretori di questo enzima. Tale scelta si è basata sull'ipotesi che questa proteasi fosse capace di idrolizzare l'OTA, analogamente a quanto noto per la CPA batterica. Inoltre sono stati utilizzati anche due ceppi di *Saccharomyces*, isolati durante la fermentazione di mosto da uve passite per la produzione di vinsanto e risultati avere un buon potere di abbattimento nei confronti dell'OTA.

Per eliminare le interazioni fra gli enzimi cellulari dei lieviti ed i fenoli molto abbondanti nei mosti, per il confronto dei diversi ceppi è stato utilizzato come substrato un terreno massimo (pH 3,2) artificialmente contaminato con 2 μ g/ml di OTA. L'assenza della frazione fenolica dei vini ha consentito, inoltre, l'analisi HPLC dei fermentati per iniezione diretta, eliminando così errori ed interferenze derivanti dalla preparazione dei campioni.

Dai risultati finora ottenuti sembra che il meccanismo predominante (se non esclusivo) responsabile della riduzione della contaminazione da OTA in fermentazione sia l'assorbimento / adsorbimento della micotossina da parte del lievito. Le prove hanno infatti mostrato che, anche ad alti livelli di contaminazione (2 μ g/ml), non si rilevano nel fermentato tracce di OT α , la isocumarina legata attraverso il gruppo carbossilico alla L- β -fenilalanina che, a seguito dell'idrolisi dell'OTA, dovrebbe residuare in qualche misura nel mezzo di coltura. Questa conclusione è supportata anche dal fatto che, in presenza dei ceppi di lievito che operano la più alta riduzione, la concentrazione di OTA nei fermentati avviene all'inizio della fermentazione (1°-2° giorno), mentre poi si ha un generale andamento ad asintoto.

Ocratossina A, lieviti, fermentazione, vino

STUDIO SULL' INTERAZIONE TRA *FUSARIUM OXYSPORUM* E *SALMONELLA* SPP. IN UN SISTEMA MODELLO

F. Cibelli¹, C. Altieri^{2*}, M. Sinigaglia²

¹Dipartimento di Scienze Agro-Ambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Foggia, Via Napoli, 25, 71100 Foggia.

²Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Foggia, Via Napoli, 25, 71100 Foggia.

* Tel.: +39 0881 589235; fax: +39 0881 589231; e-mail: c.altieri@unifg.it

Gli alimenti molto acidi, come alcune orticole e alcuni tipi di frutta, crudi e/o minimamente trattati, sono stati da sempre considerati dei substrati molto poveri per la crescita dei più comuni patogeni alimentari. Questi alimenti sono provvisti, infatti, di una barriera naturale contro i microrganismi, riconducibile tanto a struttura e morfologia, quanto alla elevata acidità ($\text{pH} \leq 4,6$). Per contro, la disacidificazione biologica, operata dalle specie fungine di maggior attacco per i prodotti vegetali in questione, favorisce la crescita e la sopravvivenza dei patogeni, essendo in grado di produrre metaboliti capaci di innalzare i livelli di pH fino ai valori che promuovono o comunque non inibiscono lo sviluppo degli stessi.

In questo studio è stato realizzato un sistema modello, costituito da Tryptone Soya Broth (TSB) addizionato con il 20 e il 50% di succo di pomodoro, preliminarmente inoculato con una sospensione conidica di *Fusarium oxysporum*, muffa di alterazione del pomodoro in post-raccolta. Dopo 5 giorni di incubazione, la muffa è stata eliminata tramite filtrazione dal substrato, e negli stessi brodi è stato inoculato un ceppo di *Salmonella* spp. (ATCC 35664) in ragione di circa 6 Log UFC/ml. Durante i 5 giorni di attività metabolica, la muffa ha determinato un incremento di pH del mezzo da 5,3 a 5,7 per il TSB al 20% di succo di pomodoro, e da 4,7 a 5,3 per il substrato al 50%. Si è così venuto a creare un ambiente più favorevole per lo sviluppo della *Salmonella* che ha infatti mostrato un incremento di sviluppo di quasi 2 cicli logaritmici rispetto al controllo, a partire dal secondo giorno dall'inoculo. Nel sistema al 50% di succo di pomodoro, il patogeno ha mostrato un aumento di crescita di 1 ciclo logaritmico dopo 3 giorni dall'inoculo, e di circa 2 cicli logaritmici dopo il sesto giorno dall'inoculo, rispetto al controllo.

I risultati mostrano che lo sviluppo di muffe, come *Fusarium* spp., su pomodoro, possono provocare incrementi di pH nel prodotto fresco, favorendo la crescita di patogeni come la *Salmonella*, aumentando quindi il rischio di infezioni e tossinfezioni accidentali nell'uomo.

Fusarium oxysporum, *Salmonella* spp., succo di pomodoro.

IMPIEGO DI SOSTANZE DI AROMA DI ORIGINE VEGETALE PER IL MIGLIORAMENTO DELLA QUALITA' MICROBIOLOGICA DEI PRODOTTI ALIMENTARI

F. Patrignani¹, N. Belletti¹, L. Iacumin², R. Di Pasqua³

¹ Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Bologna, Piazza Goedanich, 60, 47023, Cesena

² Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine, Via Marangoni, 97, 3310, Udine

³ Dipartimento di Scienza degli alimenti, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Università, 100, 80055, Portici

La pressione dei consumatori per l'eliminazione degli additivi di sintesi negli alimenti stimola la ricerca di antimicrobici naturali per prevenire o ritardare lo sviluppo microbico. Mentre esiste un'ampia letteratura sugli effetti antimicrobici *in vitro* di sostanze di origine vegetale e microbica, scarsa è la conoscenza dei meccanismi d'azione e sporadiche le effettive applicazioni negli alimenti. In questa ottica è stata avviata una ricerca, nell'ambito di un progetto PRIN2005, che coinvolge tre unità operative (UO), afferenti alle Università di Bologna, Federico II di Napoli e Udine. Essa si propone di individuare oli essenziali (OE), o loro costituenti, attivi verso microrganismi patogeni e degradativi, di studiarne i bersagli cellulari nonché di ottimizzarne le condizioni di impiego in alimenti e per la disinfezione di impianti e superfici. Le prime due UO sono impegnate nella caratterizzazione e nella valutazione dell'efficacia antimicrobica di OE agrumari ed estratti da piante spontanee autoctone. L'UO di Napoli valuta gli effetti degli OE sulle proteine di membrana e sull'integrità cellulare mentre l'UO di Bologna quelli sulla composizione degli acidi grassi di membrana e sul metabolismo cellulare. Le due UO hanno, infine, il compito di saggiare l'efficacia antimicrobica degli OE direttamente in alimenti. L'UO di Udine valuta gli effetti degli OE sulla produzione di biofilm da parte di ceppi di *Listeria monocytogenes*, scelta come specie target.

Alcuni dei risultati sino ad ora ottenuti dalle tre UO sono sintetizzati di seguito.

L'UO di Bologna ha caratterizzato mediante GC-SPME gli OE di cedro ed arancia rossa, determinandone la MIC verso ceppi appartenenti a *Pseudomonas* spp. e *Lactobacillus plantarum* e valutandone gli effetti di concentrazioni sub-letali sulla componente lipidica delle membrane e sulla produzione di metaboliti volatili. Entrambi gli OE inducono modificazioni quali-quantitative degli acidi grassi delle membrane e del loro livello di ossidazione e un incremento degli acidi grassi rilasciati.

L'UO di Udine ha valutato *in vitro* la produzione di biofilm in ceppi di *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* isolate da differenti alimenti e superfici di stabilimenti alimentari. Sono stati selezionati circa 100 ceppi e i risultati hanno mostrato che ben l'83% di questi erano in grado di produrre biofilm. Tutti i ceppi produttori di biofilm appartenevano alla specie *L.monocytogenes*. Attualmente si sta valutando *in vitro* l'attività di OE di salvia.

L'UO di Napoli ha valutato l'effetto di concentrazioni sub-letali di timolo e carvacrolo sul profilo proteico cellulare di batteri patogeni e alterativi. Inoltre, le stesse popolazioni microbiche sono state osservate al microscopio a fluorescenza dopo colorazione vitale. I risultati mostrano un effetto dell'esposizione alle sostanze saggiate a carico degli involucri cellulari, nonché sulla composizione proteica.

Oli essenziali, meccanismo d'azione, biofilm

FORMAZIONE DI BIOFILM E RESISTENZA ALLA VANCOMICINA IN *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* CNBL7032 ISOLATO DA ALIMENTI

S. Gazzola², P.S. Cocconcelli^{1,2}

¹ Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza, Italia

² Centro Ricerche Biotecnologiche, via Milano 24, 26100, Cremona, Italia

La resistenza alla vancomicina nel genere *Staphylococcus* è un rilevante problema per le infezioni causate da *Staphylococcus aureus* o da altri stafilococchi coagulasi negativi (CNS) coinvolti nelle infezioni nosocomiali. Diversi studi hanno dimostrato come alterazioni nel metabolismo della parete cellulare e la formazione del biofilm siano coinvolte nei meccanismi di resistenza ai glicopeptidi. Inoltre, in *Staphylococcus epidermidis*, la formazione di biofilm è considerato un importante meccanismo di virulenza. La capacità di questi batteri di colonizzare una superficie polimerica con biofilm coinvolge diversi geni codificanti proteine associate alla parete cellulare e ad alcune autolisine.

Durante questo lavoro di ricerca si è studiato il microrganismo *Staphylococcus epidermidis* CNBL 7032, isolato da pancetta. Questo ceppo risulta essere eteroresistente, presentando una sub-popolazione in grado di crescere in presenza di 32 µg/ml di vancomicina. *S. epidermidis* CNBL 7032, che non possiede i geni per la resistenza alla vancomicina propri degli enterococchi (*vanA* e *vanB*), produce l'enterotossina C, appartiene al secondo gruppo *agr* della specie *S. epidermidis*; ed esprime la proteina Fbe, coinvolta nel legame al fibrinogeno e nella formazione di biofilm.

L'osservazione che lo sviluppo ad alte concentrazioni di vancomicina (>16 µg/ml) avvenga solo in terreno solido e non in liquido, ha stimolato studi sul meccanismo di resistenza. L'analisi delle cellule al microscopio a trasmissione rivela che la subpopolazione resistente presenta un ispessimento della parete cellulare, proporzionale alla concentrazione di vancomicina presente nel terreno di crescita. L'analisi al microscopio elettronico a scansione ha permesso di evidenziare una struttura simile al biofilm tra le cellule di *S. epidermidis* CNBL 7032 cresciute in presenza dell'antibiotico. Inoltre la ricerca di geni coinvolti nella formazione del biofilm, tramite PCR, ha permesso di evidenziare la presenza del gene *atlE*, che codifica per un autolisina con proprietà adesive e coinvolta nella prima fase di formazione del biofilm. Lo studio dell'attività trascrizionale del gene *atlE*, di cellule sviluppate in terreno solido e in fase stazionaria di crescita, ha sottolineato una maggiore espressione del gene ad alti livelli di vancomicina (24 µg/ml e 32 µg/ml) suggerendo una interazione tra l'espressione del gene *atlE* e la resistenza ai glicopeptidi.

Staphylococcus epidermidis, vancomicina resistenza, biofilm

CEPPI VINARI DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ACCUMULANO SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO NEL CORSO DI PROCESSI FERMENTATIVI

D. Angelozzi, H. Politi, I. Mannazzu

Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università Politecnica delle Marche, 60100 Ancona

Nel corso della fermentazione alcolica i lieviti vinari sono esposti a numerosi fattori di stress che influenzandone la vitalità e le performance fermentative, possono causare rallentamenti o arresti di fermentazione (Attfield, 1997; Bauer & Pretorius, 2000; Zuzuarregui et al., 2005). In effetti, diversi autori hanno correlato la risposta allo stress del lievito con la loro capacità fermentativa (Ivorra *et al.*, 1999; Trabalzini *et al.*, 2003; Zuzuarregui & Del Olmo, 2004a; Zuzuarregui & Del Olmo, 2004b), e postulato che la resistenza allo stress debba essere considerata carattere essenziale nella selezione di ceppi vinari (Zuzuarregui & Del Olmo, 2004b).

Nell'ambito di un progetto volto alla delucidazione dei fenomeni alla base dei rallentamenti e degli arresti di fermentazione, e in considerazione del fatto che la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è un sintomo di stress precoce (Longo *et al.* 1999) sono state valutate la vitalità cellulare, l'integrità di membrana e la produzione intracellulare di ROS in ceppi vinari e di laboratorio di *S. cerevisiae* durante la fermentazione di mosto sintetico. I risultati ottenuti suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra accumulo di ROS e vitalità e integrità della membrana cellulare. Inoltre, la dinamica di accumulo delle ROS nel corso della fermentazione, valutata tramite citofluorimetria, suggerisce che l'insorgenza di sottopopolazioni caratterizzate da differenti livelli di ossidazione intracellulare preceda una perdita marcata di vitalità nella popolazione.

**BIODIVERSITÀ DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN AMBIENTE
VITIVINICOLO: CEPPI DOMINANTI LE FERMENTAZIONI ALCOLICHE
SPONTANEE DI DUE ANNATE CONSECUTIVE**

S. Augruso, G. Buscioni, L. Granchi, M. Vincenzini

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze,
P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Tel.:+390553288305; Fax: +390553288272

Numerosi studi ecologici condotti sulla fermentazione vinaria spontanea hanno evidenziato, grazie all'impiego di tecniche molecolari, che *Saccharomyces cerevisiae*, la specie di lievito responsabile del processo fermentativo, è caratterizzata da un elevato polimorfismo, vale a dire che ceppi diversi, presenti simultaneamente e/o in successione, sono coinvolti nella fermentazione alcolica. Tuttavia, questi studi, essendo stati condotti soltanto su isolati di *S. cerevisiae* provenienti da mosti in fermentazione, non hanno fornito informazioni sull'origine, la diffusione e la persistenza di tali ceppi nell'intero ambiente vitivinicolo, comprendente sia l'ecosistema vigneto che l'ecosistema cantina. Al fine di approfondire le conoscenze su tali aspetti, è stata condotta un'indagine sulla biodiversità di *S. cerevisiae* presso un'azienda produttrice di vino D.O.C.G. Brunello di Montalcino, nella quale non è stato mai fatto uso di lieviti selezionati del commercio. In particolare, tramite analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione del DNA mitocondriale (RFLP mtDNA), sono stati caratterizzati a livello di ceppo 342 isolati di *S. cerevisiae*, ottenuti da campioni rappresentativi dell'intera filiera vitivinicola: due mosti in fermentazione di due vendemmie consecutive, il terreno del vigneto di provenienza delle uve impiegate, le uve in prossimità della vendemmia e la superficie interna del tino di fermentazione impiegato.

Dalla digestione del mtDNA con le endonucleasi *RsaI* e *HinfI* sono stati complessivamente ottenuti 30 profili di restrizione, corrispondenti a 30 ceppi di lievito diversi. Due ceppi, rappresentati dai profili I e XVII, sono stati riscontrati come dominanti nei due mosti in fermentazione, nel terreno e all'interno del tino; altri 3 ceppi (profili III, XXI e XXX) sono risultati comuni ai due mosti presi in esame e di questi uno (profilo XXI) è stato rilevato anche nel terreno. Infine, due ceppi (profili XIV e XXIV) sono stati trovati sia nel terreno che nel mosto vinificato durante il secondo anno di indagine.

I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che i lieviti autoctoni responsabili della fermentazione alcolica siano tipici residenti dell'ambiente vitivinicolo e possano permanere nell'arco di vendemmie successive sia nell'ecosistema cantina (tino di fermentazione) che nell'ecosistema vigneto (terreno coltivato).

S. cerevisiae, biodiversità, DNA mitocondriale.

MIGLIORAMENTO GENETICO E SELEZIONE DI STARTER VINARI AUTOCTONI

M. Budroni, D. Orro, G. Ladu, G. Zara, S. Zara, L. Cubaiu, G.A. Farris

Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Sezione di Microbiologia Generale ed Applicata, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100, Sassari.

L'uso consolidato di starter vinari commerciali ha favorito la gestione del processo produttivo ma ha causato una sempre più accentuata standardizzazione del prodotto finito. Allo scopo di esaltare le caratteristiche sensoriali della Vernaccia DOC e del Cannonau DOC, due vini tipici della Sardegna, nel presente lavoro si è proceduto alla selezione e al miglioramento di ceppi vinari autoctoni da utilizzare sia come starter fermentativi (Cannonau) che per il successivo affinamento del prodotto (Vernaccia). 60 ceppi di lievito, isolati da mosti e vini Cannonau in sei aree vitivinicole della Sardegna, sono stati caratterizzati tecnologicamente e molecolarmente tramite ITS e minisatelliti. I risultati ottenuti hanno permesso di individuare ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* caratterizzati da un'elevata capacità di estrarre e mantenere elevata la frazione polifenolica delle uve Cannonau. Per quanto riguarda l'affinamento, si è proceduto al miglioramento di un ceppo flor di *S. cerevisiae* isolato dalla Vernaccia di Oristano DOC. La metodologia di miglioramento utilizzata si basa sul particolare ciclo vitale semiomotallico di questi ceppi. Fra i ceppi migliorati, caratterizzati da una elevata stabilità genetica in quanto omozigoti a tutti i loci, uno in particolare si è mostrato capace di formare il velo più precocemente del ceppo parentale e di conferire delle note aromatiche caratteristiche al prodotto finito già dopo un solo anno di affinamento.

Ceppi autoctoni di *S. cerevisiae*, Cannonau, Vernaccia, miglioramento genetico, PCR-RFLP, PCR-fingerprinting.

CONTROLLO DEL PROCESSO DI VINIFICAZIONE MEDIANTE LEC IN ALTERNATIVA ALL'AGGIUNTA DI SO₂ NEI MOSTI D'UVA

G. Lustrato, G. Ranalli

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Ambientali e Microbiologiche (DISTAAM), Università degli Studi del Molise, Campobasso

Recentemente grande attenzione è stata rivolta all'uso di additivi chimici negli alimenti, alle interazioni del loro consumo quotidiano e il possibile rischio per la salute umana. Composti dello zolfo, nelle loro varie forme, sono usati per preservare e conservare gli alimenti e bevande. Nel processo di vinificazione l'aggiunta di SO₂ al mosto d'uva è pratica usuale nel controllo delle reazioni di ossidazione e nel limitare la crescita della microflora indigena alterante. Tale pratica ha la finalità di inibire la crescita di lieviti non-*Saccharomyces* (*Kloeckera* e *Hanseniaspora* spp.) e di incoraggiare selettivamente la crescita e la sopravvivenza di lieviti ellittici. Tuttavia, l'aggiunta di SO₂ comporta rischi come l'induzione di fenomeni mutageni accertati in test condotti in laboratorio su microrganismi. Appare evidente come sistemi e tecniche alternative all'uso di SO₂ che inibiscono in maniera selettiva i lieviti apiculati sia un traguardo ambito. Studi recenti basati sull'utilizzo dei trattamenti elettrici finalizzati all'inattivazione di microrganismi nel sistema alimento hanno avuto sempre più spazio e diffusione. Al fine di contribuire alla comprensione dei fenomeni correlati agli effetti di basse intensità di corrente elettrica (LEC) in campo enologico come "new preservation process", sono stati condotti test di vinificazione con starter di lievito commerciale (*S. cerevisiae*) durante le fasi iniziali di fermentazione in mosto d'uva Trebbiano (Lustrato *et al.* 2006). In due reattori industriali inox da 30.000, sono state condotte le fermentazioni dei mosti. Il primo è stato equipaggiato con un elettrodo al titanio, 200 mA, 3.5 Volts, per 16 giorni. Il secondo è stato addizionato soltanto con 80 mg l⁻¹ di SO₂ (controllo). I vini finali ottenuti dai due differenti trattamenti, sono stati caratterizzati attraverso parametri microbiologici, chimici e sensoriali. I risultati dimostrano come il trattamento con basse intensità di corrente elettrica abbia effetti positivi sulla fermentazione del mosto d'uva durante le fasi iniziali di vinificazione. Inoltre, la composizione chimica dei vini tra le due tesi non mostravano variazioni significative. In conclusione, i risultati ottenuti sono di grande importanza nello sviluppo di tecnologie innovative di vinificazione, nel controllo del processo fermentativo dei lieviti in mosti d'uva, rappresentando una valida alternativa all'aggiunta/sostituzione di SO₂. Ulteriori ricerche e innovazioni con l'uso di basse intensità di corrente elettrica (LEC) sono fortemente auspicabili in questo settore.

Corrente elettrica, basso voltaggio, lieviti, SO₂, vino.

DIVERSITÀ GENETICA E TECNOLOGICA PER LA SELEZIONE DI CEPPI STARTER DA UTILIZZARE IN FERMENTAZIONE GUIDATA DI SPECIFICHE VARIETÀ D'UVA

A.Capece, C. Fiore, V. Serafino, R. Romaniello, P. Romano

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali – Università degli Studi della Basilicata- Viale dell'Ateneo Lucano, n° 10 – 85100 Potenza; e-mail: cepeceang@yhao.it

La pratica della fermentazione guidata con l'inoculo di ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae* è ampiamente diffusa a livello industriale. Le colture starter attualmente disponibili sul mercato sono state accuratamente selezionate per parametri di interesse tecnologico, ma il loro uso indiscriminato per la trasformazione di uve di differente varietà e composizione ha determinato la sostituzione della microflora autoctona presente nel corso della fermentazione spontanea, provocando la perdita di caratteristiche organolettiche tipiche di quel vino. Infatti, è ampiamente dimostrato che il profilo sensoriale del vino è strettamente correlato al ceppo di lievito che ha condotto e/o ha dominato il processo fermentativo. *S. cerevisiae* nel corso della fermentazione alcolica oltre a produrre etanolo, forma numerosi composti secondari che influenzano la qualità organolettica del vino. Il livello di produzione di questi composti è influenzato dalla composizione del mosto di partenza che fornisce i precursori, metabolizzati poi dall'attività fermentativa del lievito. I parametri biologici, ovvero varietà di uva e starter, hanno il ruolo principale nel determinare la qualità finale del vino e questa consapevolezza ha stimolato negli ultimi anni una crescente richiesta da parte del mercato di ceppi autoctoni selezionati in grado di esaltare le caratteristiche tipiche del vitigno.

In questo lavoro riportiamo alcuni risultati relativi a studi condotti su ceppi selvaggi di *S. cerevisiae* isolati da Aglianico del Vulture, allo scopo di sottolineare l'importanza di selezionare lo *starter* in funzione della varietà d'uva. I ceppi sono stati caratterizzati sia dal punto di vista genetico che tecnologico. La caratterizzazione genetica è stata condotta mediante "PCR *fingerprinting*" dei microsatelliti con i primers GAC₅ e GTG₅ ottenendo un significativo grado di polimorfismo genetico. Per la caratterizzazione tecnologica, sono state condotte fermentazioni su scala di laboratorio inoculando i ceppi in mosto Aglianico del Vulture. I vini sperimentali a fine fermentazione sono stati analizzati per il contenuto di composti secondari, quali alcoli superiori, acetaldeide ed acetato di etile, riscontrando una significativa variabilità in funzione del ceppo inoculato, soprattutto per quanto riguarda i livelli di isobutanolo e alcol isoamilico. Alcuni ceppi, caratterizzati da un diverso livello di produzione di composti secondari, sono stati inoculati in mosto Aglianico su scala pilota e anche in questo caso il profilo sensoriale dei vini ottenuti è risultato significativamente differente in funzione del ceppo inoculato. L'elevata variabilità riscontrata tra i ceppi analizzati sottolinea l'importanza di selezionare colture starter specifiche per il mosto da fermentare, in modo da ottimizzare la combinazione mosto d'uva-ceppo di *S. cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae, microsatelliti, polimorfismo di ceppo, composti secondari, interazione ceppo di lievito/mosto d'uva

CARATTERIZZAZIONE FISIOLÓGICA E MOLECOLARE DI CEPPI DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ISOLATI DURANTE LA FERMENTAZIONE DEL VINSANTO

¹P. Domizio, ²P. Vignozzi, ³S. Tegli, ¹L. Lencioni, ³M. Ciani

¹Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione Tecnologie Alimentari, Università degli studi di Firenze, Via Donizetti 6, 50144 Firenze, Italy.

²Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione Patologia Vegetale, Laboratorio di Patologia Vegetale Molecolare, Università degli studi di Firenze, Via della Lastruccia 10, 50019 Sesto Fiorentino, Firenze, Italia.

³Dipartimento di Scienze degli alimenti, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italia

E-mail: domizio@unifi.it.

L'elevata concentrazione zuccherina presente nel mosto ottenuto da uve passite può rappresentare una notevole fonte di stress per i lieviti, che, tra l'altro, in seguito alla fermentazione, devono essere anche in grado di svilupparsi in presenza di elevate gradazioni alcoliche e di alti livelli di acetaldeide. Si tratta di una condizione naturale nella quale le particolari caratteristiche chimiche del substrato, abbinate alla realizzazione di numerosi cicli riproduttivi, possono indurre una frequenza di mutazioni superiore a quella normale, che, combinata con un aumento dell'incidenza di eventi di ricombinazione genetica, comporta un aumento del livello di variabilità della popolazione nel suo insieme.

Al fine di valutare l'influenza di questo particolare substrato sulla popolazione di lieviti *Saccharomyces* naturalmente presenti durante la fermentazione del Vinsanto, 60 ceppi di lievito sono stati isolati e caratterizzati sia dal punto di vista fisiologico che da quello molecolare.

Caratterizzazione fisiologica: gli isolati sono stati utilizzati in prove di fermentazione condotte su mosto d'uva con due differenti concentrazioni zuccherine (24 e 33 % p/v). Oltre a seguire la cinetica fermentativa di ciascun ceppo nelle due diverse condizioni, a fine fermentazione i prodotti sono stati sottoposti ad alcune analisi di base. Sono stati inoltre valutati, mediante screening su piastra, ulteriori caratteri tecnologici quali la presenza del carattere Killer, la produzione di idrogeno solforato, la presenza di attività enzimatiche idrolitiche (attività glicosidasi β -glucosidasi ed esterasica). I ceppi che durante questa prima selezione hanno mostrato i prerequisiti per un buon processo fermentativo sono stati scelti e utilizzati per ulteriori prove di fermentazione, nelle quali sono stati anche determinati, per via gas-cromatografica, i rispettivi profili aromatici.

Caratterizzazione molecolare: gli isolati sono stati caratterizzati a livello molecolare, interspecifico e intraspecifico. La caratterizzazione a livello interspecifico ha previsto l'amplificazione *via* PCR della regione ITS dell'rDNA. Il DNA dei ceppi di lievito precedentemente caratterizzati come appartenenti alla specie *S. cerevisiae* è stato quindi sottoposto ad amplificazione *via* PCR utilizzando i primer DC4FA e DC4RA, specifici per la suddetta specie.

Le analisi sopra effettuate, oltre ad evidenziare la coesistenza di ceppi di lievito anche molto diversi durante tutto il processo fermentativo, hanno anche consentito di identificarne alcuni aventi interessanti caratteristiche enologiche.

Fermentazione, *Saccharomyces*, Vinsanto

INFLUENZA DEL CEPPPO DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SULLA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE DEL VINO VALUTATA MEDIANTE FOTOCHEMIOLUMINESCENZA

C. Fiore¹, A. Maietti², P. Tedeschi², V. Brandolini², P. Romano¹

¹Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali – Università degli Studi della Basilicata - Viale dell'Ateneo Lucano, n° 10 – 85100 Potenza; e-mail: concetta14@hotmail.com

²Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Ferrara, Via Fossato di Mortara 17, 44100 Ferrara

Tra le numerose variabili che determinano la qualità finale di un vino, il ceppo di lievito, che partecipa e/o domina il processo fermentativo, svolge un ruolo essenziale. Attraverso l'attività metabolica infatti, favorisce la formazione di numerosi composti che esaltano il *flavour* del prodotto. E' ampiamente riconosciuto che i lieviti producono durante la fermentazione del mosto numerosi composti i quali, in funzione delle loro quantità, svolgono un effetto positivo o negativo sulla qualità organolettica e salutistica del vino. Tra i composti che esercitano un effetto positivo troviamo i polifenoli che sono considerati una fonte di antiossidanti naturali ed il cui contenuto totale è correlabile all'attività svolta dai lieviti. In questo lavoro sono riportati i risultati di uno studio sulla capacità antiossidante in funzione del ceppo di *Saccharomyces cerevisiae*. Numerosi ceppi di questa specie sono stati saggiati in fermentazione su scala pilota con mosto Aglianico del Vulture. A fine fermentazione nei vini sperimentali ottenuti sono stati valutati la capacità antiossidante, il contenuto di etanolo e di polifenoli totali. La capacità antiossidante è stata determinata mediante Photochem®, uno strumento basato sul principio della fotochemioluminescenza. Al nono giorno di fermentazione i vini sperimentali avevano un'attività antiossidante compresa tra 2,88 e 6,25 μ mol/L di acido ascorbico equivalente, un contenuto di alcol tra 5,49 e 10,99 % e di polifenoli totali tra 1152 e 1733 mg/L di catechina. Al dodicesimo giorno in tutti i vini è stato registrato un aumento del contenuto in etanolo e polifenoli totali. E' interessante notare che il potere antiossidante totale dei vini sperimentali è risultato dipendere dal ceppo di *S. cerevisiae* che ha guidato la fermentazione. Questo studio preliminare sull'influenza di *S. cerevisiae* sulla capacità antiossidante e il contenuto di polifenoli totali nel processo di vinificazione indica che i ceppi starter selezionati giocano un ruolo fondamentale nel determinare la qualità di un vino e influenzare così la shelf-life del prodotto. In conclusione, diventa pertanto vantaggioso selezionare culture starter per vinificazione anche in funzione della loro potenzialità positiva nell'esaltare la capacità antiossidante totale di un vino.

Saccharomyces cerevisiae, vino, capacità antiossidante totale, polifenoli totali.

**SELEZIONE DI LIEVITI AUTOCTONI NELL'AREA DI PRODUZIONE DEL
PROSECCO: DISTRIBUZIONE E BIODIVERSITÀ DI CEPPI DI
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

E. De Bortoli¹, F. Zilio², R. Baladin¹, M. Carlot¹, T. Nardi¹, A. Lombardi², A. Giacomini^{1,3}, V. Corich^{1,3}

¹Università di Padova, sede di Conegliano Veneto (TV). ²Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Thiene (VI). ³Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova, Italy. Email: elena.debortoli@unipd.it

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di isolare lieviti autoctoni in grado di apportare maggiori caratteristiche di tipicità al vino Prosecco. A questo scopo l'intera area viticola della DOC è stata suddivisa in 37 località dalle quali sono stati raccolti 354 campioni, ognuno costituito da un grappolo d'uva. Ogni campione è stato lasciato fermentare spontaneamente e a fine fermentazione da ciascun campione sono state isolate un massimo di 16 colonie.

E' stato sviluppato un metodo *ad-hoc* di multiplex PCR per identificare i lieviti appartenenti al gruppo dei *Saccharomyces sensu stricto*, nell'ambito del quale si annoverano le principali specie di interesse enologico. Un totale di 484 isolati è stato testato e 296 sono risultati *Saccharomyces sensu stricto*, provenienti da 30 campioni dei 354 di partenza. I lieviti *Saccharomyces sensu stricto* sono stati caratterizzati a livello di ceppo mediante analisi dei profili di restrizione del DNA mitocondriale. Dall'analisi dei profili elettroforetici ottenuti sono stati individuati 38 diversi ceppi raggruppati in base al grado di similarità. I due profili più rappresentati hanno frequenze del 29% e del 17%, la maggior parte dei profili presenta una frequenza inferiore al 5% e 12 di essi sono stati osservati una sola volta.

Per quanto riguarda la distribuzione geografica solamente da 11 località campionate delle 37 totali sono stati isolati lieviti *Saccharomyces*. Inoltre i due profili che presentano una maggiore frequenza sono anche quelli più diffusi nel territorio mentre gli altri profili sembrano essere tipici della microarea di isolamento.

CONTROLLO DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA IN VIN SANTO

S.Paolillo, D. Ganucci, L. Granchi, M. Vincenzini

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze
P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Tel.:+390553288308; Fax: +390553288272

Il Vin Santo è un prodotto tradizionale della Toscana ottenuto da uve sottoposte ad appassimento naturale e successivamente fermentate in piccole botti di legno (caratelli), mantenute sigillate per un periodo di almeno 3 anni. Le conoscenze relative all'ecologia microbica del processo produttivo sono piuttosto scarse per oggettive difficoltà di indagine, mentre più numerosi risultano i dati relativi alla composizione chimica del prodotto finito. Dai dati disponibili emerge una grande variabilità nelle concentrazioni degli acidi L-lattico e L-malico. Questo aspetto fa supporre che la fermentazione malolattica (FML) avvenga nel Vin Santo con decorso non regolare, analogamente a quanto si verifica in vino.

Al fine di approfondire le conoscenze sullo svolgimento della FML e sulle possibilità di un suo controllo in Vin Santo, è stato condotto un monitoraggio delle popolazioni di batteri lattici in numerosi caratelli, contenenti lo stesso mosto e nei quali, al momento della chiusura, è stato inserito un tubo di piccolo diametro per poter effettuare periodici campionamenti durante il processo produttivo. Nella presente nota, vengono riportati i risultati relativi all'andamento della FML e al controllo dei batteri lattici mediante l'impiego di lisozima. In particolare, la sperimentazione ha previsto l'aggiunta di lisozima (50 g/hl) in due caratelli in tempi successivi in modo da verificare la sua efficacia in corrispondenza delle fasi di crescita attiva e stazionaria dei batteri lattici; un terzo caratello è stato utilizzato come controllo. In questo caratello, la popolazione lattica, costituita da *Oenococcus oeni*, ha avviato la FML 6 mesi dopo l'ammestatura delle uve, in presenza di una concentrazione di etanolo di circa 13,5% in volume e di una quantità di zuccheri residui pari a circa 130 g/l, ed è rimasta vitale su valori di circa 10^6 UFC/ml per quasi un mese dopo l'esaurimento dell'acido malico. Nei caratelli trattati con lisozima, la persistenza della popolazione lattica è stata significativamente inferiore a quella del caratello controllo, limitando i rischi derivanti da una possibile degradazione batterica degli zuccheri residui. Più precisamente, il lisozima si è dimostrato più efficace quando è stato usato in fase di attiva moltiplicazione dei batteri lattici, riuscendo a far decrescere la popolazione lattica da 10^6 UFC/ml a valori inferiori a 1 UFC/ml in soli 3 giorni. Pertanto, anche in una matrice complessa e ricca di zuccheri come il Vin Santo, l'uso del lisozima per il controllo delle popolazioni di batteri lattici rappresenta una valida alternativa all'impiego della anidride solforosa.

Vin Santo, lisozima, fermentazione malolattica

VARIABILITÀ NELLA FORMAZIONE DI BIOFILM IN DIVERSI CEPPI FLOR DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

S. Zara, C. Pinna, G. Zara, G.A. Farris, M. Budroni

Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Sezione di Microbiologia Generale ed Applicata, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italia.

I microrganismi in natura si sviluppano prevalentemente sotto forma di biofilm, grazie alla notevole capacità che la cellula microbica ha di aderire a superfici inerti, cellule e tessuti. Questo tipo di adesione ha notevoli implicazioni mediche e industriali. In lievito l'adesione è legata alla produzione di proteine specifiche chiamate adesine. In *Saccharomyces cerevisiae* queste proteine sono codificate da geni appartenenti alla famiglia *FLO*, di localizzazione telomerica o subtelomerica, le cui ORF sono caratterizzate dalla presenza di un numero variabile di sequenze ripetute che codificano per il dominio dell'adesina, ricco in serina e treonina. Un nostro precedente lavoro che proponeva un modello per la formazione del biofilm basato sull'abilità delle cellule, altamente idrofobiche, di intrappolare l'anidride carbonica consentendone il galleggiamento, ha dimostrato come *FLO11* rivesta un ruolo fondamentale per la formazione di biofilm su superfici liquide. Altri autori hanno dimostrato che al variare del numero di sequenze ripetute si hanno alterazioni quantitative nell'adesione, nella flocculazione e nella formazione di biofilm, a causa della plasticità ricombinogena delle zone ripetute, che conferisce maggiore adattabilità del ceppo al variare delle condizioni ambientali. Poiché è noto che ceppi flor diversi hanno differente attitudine alla florizzazione, sia come velocità di formazione che come quantità in peso del biofilm, abbiamo voluto analizzare le possibili correlazioni tra le diverse taglie di *FLO11* e l'adesione cellulare. Per questo sono stati analizzati 21 ceppi flor di *Saccharomyces cerevisiae*. Per tutti i ceppi sono stati amplificati sia l'intero gene sia la zona intragenica delle sequenze ripetute. I risultati ottenuti mostrano correlazioni variabili fra le diverse taglie di *FLO11* ed i fenotipi ad essi associate.

FLO11, adesine, biofilm, sequenze intrageniche

SACCHAROMYCES CEREVISIAE DA AGLIANICO DEL VULTURE: VALUTAZIONE DELLA BIODIVERSITÀ DI CEPPO MEDIANTE METODI MOLECOLARI E TEST DI RESISTENZA

R. Romaniello, P. Romano

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali – Università degli Studi della Basilicata- Viale dell'Ateneo Lucano, n° 10 – 85100 Potenza; e-mail: rossanaromaniello@yahoo.it

Le diversità tecnologiche esistenti tra i diversi ceppi vinari sono determinate dalle differenze nel patrimonio genetico e sono spesso di difficile valutazione con i metodi fisiologici e biochimici classici. La caratterizzazione valutando parametri morfologici, fisiologici e metabolici è complessa e laboriosa e sono necessari molti test per ottenere risultati certi. Negli ultimi anni si è assistito ad una rapida diffusione delle tecniche molecolari che permettono di ottenere risultati affidabili in tempi brevi. Tecniche molecolari, quali l'analisi RAPD-PCR, l'analisi del cariotipo elettroforetico, l'analisi di restrizione del DNA mitocondriale permettono di ottenere il cosiddetto "fingerprinting" molecolare, ovvero l'impronta digitale molecolare univoca e riproducibile di un dato ceppo di lievito.

Lo studio riportato ha riguardato la caratterizzazione genetica e tecnologica di isolati della stessa origine al fine di evidenziarne la variabilità di ceppo. Numerosi ceppi selvaggi, appartenenti alla specie *S. cerevisiae*, isolati da fermentazioni di uve Aglianico del Vulture, sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare. Il DNA dei ceppi analizzati è stato sottoposto ad amplificazione mediante RAPD-PCR, utilizzando il primer (GTG₅), allo scopo di mettere in evidenza il polimorfismo genetico. I profili molecolari ottenuti sono stati sottoposti ad analisi cluster con il metodo "Complete Linkage" utilizzando il coefficiente di Pearson. I risultati hanno evidenziato un significativo grado di variabilità di ceppo indice della naturale biodiversità determinata dall'habitat vigna. Inoltre, i ceppi sono stati saggiati per caratteri di interesse tecnologico, quali la resistenza ad additivi impiegati in enologia, anidride solforosa e rame, e la tolleranza all'etanolo, che è un parametro indispensabile per lo starter vinario. La maggior parte dei ceppi ha esibito livelli accettabili delle caratteristiche saggate. Una notevole variabilità di comportamento è stata riscontrata soprattutto nei confronti della resistenza al rame, carattere rilevante nella selezione di starter per fermentazione di uve biologiche. I test di resistenza all'etanolo ed alla solforosa hanno evidenziato una maggiore omogeneità di comportamento da cui si discostano solo alcuni ceppi che hanno esibito livelli di resistenza superiori alla media.

I risultati di questo studio confermano l'esistenza di una significativa, a volte anche considerevole, variabilità genetica e tecnologica della specie *S. cerevisiae*. Inoltre hanno permesso di individuare i biotipi dominanti dell'ambiente "vigna Aglianico del Vulture", che rappresentano la base da cui selezionare specifici ceppi selvaggi di *S. cerevisiae*, in possesso di caratteristiche enologiche idonee per guidare la fermentazione di questa varietà di mosto, tenendo conto dei caratteri di tipicità del vitigno e di quelle del vino che si vuole ottenere.

Saccharomyces cerevisiae, polimorfismo genetico, RAPD-PCR, resistenza ad additivi tecnologici

FURANONI QUALI POSSIBILI MOLECOLE SEGNALATRICI IN ALCUNI BATTERI GRAM POSITIVI E GRAM NEGATIVI

L. Vannini, P. Saracino, M. Ndagijimana, F. Patrignani, M. Vallicelli, P. Vernocchi, R. Lanciotti, M. E. Guerzoni

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Bologna, via Fanin 46, 40127 Bologna

I microrganismi rispondono agli stress di natura chimica-fisica attraverso una serie di meccanismi molti dei quali sono regolati dal rilascio di molecole segnalatrici, ovvero molecole extracellulari coinvolte nei fenomeni di comunicazione cellula-cellula. Il quorum sensing è da intendersi come una particolare forma di comunicazione cellula-cellula in cui i geni sono espressi in modo dipendente dalla densità cellulare dopo che una concentrazione critica di molecole segnalatrici (autoinduttori) è stata raggiunta. I batteri Gram positivi utilizzano principalmente sostanze di natura peptidica come segnalatori, mentre molti batteri Gram negativi gli N-acil-omoserina lattoni (AHL), ed in particolare una molecola definita autoinduttore AI-2 che è in grado di indurre bioluminescenza in un organismo test quale *Vibrio harveyi*.

I furanoni sono composti naturalmente presenti in frutti come fragole od in alcune specie vegetali. Inoltre, essi partecipano ad un'ampia varietà di fenomeni biologici. Alcuni Autori hanno riportato la produzione extracellulare di 3(2H)-furanoni, quali l'HDMF e l'HMF, che sono strutturalmente simili agli AHL. In considerazione del fatto che HDMF ed HMF sono molecole considerate cruciali per l'aroma della salsa di soia, di formaggi quali Emmenthal, Pecorino, Grana Padano e Cheddar e che sono state identificate come costituenti di numerosi alimenti fermentati da lieviti o batteri lattici (birra, formaggi, miso..), i meccanismi della loro biosintesi ed il significato e gli effetti del loro rilascio nei sistemi alimentari sono potenzialmente di elevata rilevanza tecnologica.

In tale lavoro è stato valutato l'effetto di stress subletali di tipo ossidativo, chimico ed osmotico sul rilascio di furanoni da parte di batteri sia Gram positivi, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. sanfranciscensis* e *Lb. plantarum*, che Gram negativi quale *Salmonella enteritidis*. L'analisi mediante GC-SPME dei composti volatili ha messo in evidenza che tali molecole sono rilasciate dai batteri sia Gram positivi, che negativi e che la loro secrezione aumenta drasticamente a seguito dell'esposizione delle cellule a stress di tipo ossidativo e chimico. Nel caso di *L. helveticus* è stato inoltre dimostrato che i furanoni prodotti sono dotati di bioattività nei confronti di cellule dello stesso ceppo in quanto in grado di generare modificazioni morfologiche delle cellule ed autolisi.

Molecole segnalatrici, 3(2H)-furanoni, batteri Gram-positivi, batteri Gram-negativi

PRODUZIONE DI POLISACCARIDI PARIETALI DURANTE LA FERMENTAZIONE ALCOLICA CONDOTTA A TRE TEMPERATURE DA PARTE DI CEPPI MUTANTI AUTOLITICI DI *S. CEREVISIAE* VS IL CEPPO PARENTALE

G. Giovani, F. Nannelli, I. Rosi

Università di Firenze, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione di Tecnologie Alimentari, Via Donizetti, 6 – 50144 Firenze

I polisaccaridi rappresentano uno dei principali gruppi di macromolecole presenti nei vini e possono avere origine sia dall'uva che dai microrganismi. *Saccharomyces cerevisiae* è in grado di riversare nel mezzo polisaccaridi di origine parietale, non soltanto durante il contatto prolungato delle cellule di lievito con il vino stesso, in seguito all'attivazione del processo autolitico, ma anche durante la fermentazione alcolica, quando le cellule sono in attiva fase di crescita. In quest'ultimo caso, il rilascio di macromolecole è strettamente dipendente sia dal ceppo di lievito che dalle condizioni di fermentazione. I polisaccaridi parietali rilasciati da *S. cerevisiae* svolgono un ruolo importante nell'esaltare i caratteri di qualità dei vini, migliorandone il profilo sensoriale, la stabilità chimico fisica e favorendo l'instaurarsi della fermentazione malolattica. Uno dei modi per poter incrementare il contenuto di polisaccaridi nei vini può essere rappresentato dall'utilizzo di ceppi mutanti autolitici di *S. cerevisiae*, alterati nell'integrità della parete cellulare. Nel presente lavoro, un ceppo di *S. cerevisiae* selezionato per vinificazione è stato sottoposto a mutagenesi tramite trattamento con raggi UV e sono stati ottenuti 14 mutanti autolitici termosensibili, 5 dei quali sono stati utilizzati insieme al ceppo parentale per fermentare un mosto sintetico privo di polisaccaridi a tre diverse temperature (28, 32 e 34 °C). I risultati ottenuti hanno mostrato che, in generale, i mutanti termosensibili hanno rilasciato nel mezzo di fermentazione una maggiore quantità di polisaccaridi rispetto al ceppo parentale. In particolare, a 28 °C, la quantità rilasciata dai ceppi mutanti è risultata quasi doppia in confronto al ceppo parentale. Tuttavia l'incremento di temperatura non ha favorito il rilascio di tali macromolecole nel mezzo. Al contrario, la vitalità cellulare a fine fermentazione e la performance fermentativa dei mutanti e del ceppo parentale è diminuita a 34 °C. Poiché in nessuna condizione è stata trovata una correlazione tra la perdita di vitalità cellulare e la quantità di polisaccaridi rilasciata dai ceppi di lievito, si può supporre che la mutazione, determinando un fenotipo con una parete più instabile, abbia favorito il rilascio di macromolecole nel mezzo, da parte di cellule vive.

Mutanti autolitici, *S. cerevisiae*, polisaccaridi, fermentazione alcolica

VALUTAZIONE DELLA MICROFLORA DI LIEVITI IN FERMENTAZIONI SPONTANEE DI NERO D'AVOLA MEDIANTE ANALISI MOLECOLARE

V. Serafino, R. Romaniello, A. Capece, P. Romano

Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali – Università degli Studi della Basilicata- Viale dell'Ateneo Lucano, n° 10 – 85100 Potenza; e-mail: sv990agr@unibas.it

L'industria enologica per migliorare le caratteristiche qualitative del vino può intervenire non solo sulla qualità della materia prima e sulle tecnologie del processo fermentativo, ma anche sulla scelta dei lieviti che intervengono nel processo di vinificazione. I fattori determinanti la qualità e la tipicità dei vini prodotti sono principalmente il vigneto e la sua collocazione e i lieviti considerati gli attori principali della vinificazione, che con le loro attività metaboliche influenzano la composizione finale dei vini. Nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzato alla salvaguardia del patrimonio genetico dei microrganismi autoctoni, sono stati studiati i lieviti selvaggi da Nero d'Avola. Campioni di uve di questa varietà raccolti in diversi vigneti degli areali della provincia di Caltanissetta (C), Ragusa (R) e Trapani (T) sono stati pigiati in laboratorio e lasciati fermentare. Dalla fermentazione spontanea sono stati isolati i lieviti dominatori delle varie fasi fermentative, utilizzando substrati colturali specifici per l'individuazione e l'isolamento di diverse tipologie di colonie, che dopo l'esame microscopico della morfologia cellulare, sono state sottoposte direttamente ad amplificazione, senza previa estrazione del DNA, utilizzando i *primers*: ITS1 e ITS4, seguita da analisi di restrizione con l'enzima *Hae* III. Dalla combinazione delle dimensioni molecolari del frammento ITS e dei frammenti ottenuti dall'analisi di restrizione, sono stati ritrovati 5 diversi profili: A= *Metschnikowia pulcherrima*, B= *Candida stellata*, C= *Kluyveromyces thermotolerans* /*Zygosaccharomyces cidri*/*Zygosaccharomyces fermentati*, D= *Zygosaccharomyces bailii/bisporus* o *Torulaspora delbrueckii*, E= *Saccharomyces cerevisiae*/*S.paradoxus*. I profili più diffusi sono risultati B, C, D, e soprattutto E. Il lavoro è poi proseguito sugli isolati con profilo E. Per evidenziare il polimorfismo genetico esistente tra i *S.cerevisiae*/*S.paradoxus*. isolati dalle uve Nero d'Avola, i ceppi sono stati caratterizzati mediante analisi RAPD-PCR con il *primer* M13. I profili molecolari ottenuti dall'amplificazione sono stati sottoposti ad analisi cluster e il dendrogramma ottenuto dall'analisi statistica dei profili molecolari evidenzia l'esistenza di un significativo grado di variabilità genetica tra gli isolati, correlato in alcuni casi alla loro provenienza. Gli isolati si sono distribuiti in due gruppi principali, ognuno dei quali può essere ulteriormente suddiviso in sottogruppi. Uno dei due gruppi racchiude circa l'80% dei ceppi isolati nell'area di Ragusa, mentre nell'altro gruppo sono inclusi l'85% dei ceppi isolati nella zona di Caltanissetta e il 75% dei ceppi provenienti dall'area di Trapani. All'interno dei sottogruppi è stata ritrovata una corrispondenza non solo con l'area, ma anche con la vigna di isolamento. Lieviti vinari, regione ITS, RAPD-PCR analisi, *Saccharomyces cerevisiae*, polimorfismo genetico

INDAGINI SULLA BIODIVERSITÀ DEI LIEVITI IN CAMPIONI NATURALI PROVENIENTI DAL CAMERUN

M. Stringini, F. Comitini, M. Ciani

Dipartimento di Scienze degli Alimenti – Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche, 60131 Ancona, (gruppo.ciani@univpm.it)

Frutti e vegetali sono importanti micro-habitats naturali per la diffusione e la presenza di lieviti. Allo scopo di indagare sulla biodiversità dei lieviti in tali ambienti, abbiamo raccolto vari campioni provenienti da differenti habitat naturali del Camerun. La biodiversità dei lieviti è stata valutata sia attraverso tradizionali metodi microbiologici che impiegando tecniche di biologia molecolare e confrontando poi i risultati ottenuti dalle due metodiche.

Il primo passo è stato quello di studiare la popolazione dei lieviti naturalmente presenti nei frutti e vegetali esaminati effettuando una valutazione quantitativa mediante quattro differenti substrati colturali. Per ciascun tipo di macromorfologia della colonia trovata sono stati ottenuti degli isolati che sono poi stati caratterizzati fenotipicamente con i metodi correntemente usati nella tassonomia dei lieviti. Sono state inoltre utilizzate tecniche di arricchimento usando mosto sterile per individuare i lieviti fermentanti scarsamente rappresentati e diffusi in natura come ad esempio la specie *Saccharomyces cerevisiae*. Gli isolati sono stati quindi caratterizzati impiegando metodi molecolari amplificando la regione 5.8S rDNA con primers ITS e digerendo successivamente gli amplificati con enzimi di restrizione.

Oltre alla caratterizzazione degli isolati, è stato estratto il DNA microbico totale direttamente dai campioni senza la classica procedura di isolamento dei lieviti. Il DNA totale è stato amplificato mediante NL-PCR e gli ampliconi ottenuti sono stati analizzati con gel di elettroforesi con gradiente denaturante (DGGE). I risultati hanno mostrato che i diversi approcci utilizzati sono stati utili per descrivere la biodiversità dei lieviti presenti in questi ambienti naturali.

Frutti, vegetali, lieviti, biodiversità, DGGE.

ECOLOGIA MICROBICA DI UN IMPASTO ACIDO IMPIEGATO NELLA PRODUZIONE DI BISCOTTI TRADIZIONALI

M. Carobbi, S. Guerrini, M. Vincenzini

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze,
P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Tel.:+390553288396; Fax: +390553288272

Un impasto acido tradizionale è costituito da acqua e farina ed è fermentato da batteri lattici e lieviti; i rinfreschi, ossia l'aggiunta quotidiana di nuova acqua e farina ad una porzione preesistente ("madre") di impasto acido, assicurano la stabilità della microflora ed il suo potere acidificante e lievitante. Buona parte dei prodotti lievitati da forno italiani è ottenuta da impasti acidi di questo genere, ma le informazioni disponibili sulla ecologia microbica di processi produttivi a livello industriale sono assai scarse. Al fine di fornire un contributo su tale aspetto, sono state eseguite, nei diversi periodi dell'anno, analisi microbiologiche e chimiche durante tutte le fasi di produzione industriale di un tipico prodotto da forno tradizionale, il Lagaccio di Genova.

Per la conta, l'identificazione ed il monitoraggio dei batteri lattici è stato utilizzato il terreno di coltura maltosio-MRS (pH 5,6) integrato con estratto fresco di lievito e pimaricina; per i lieviti, invece, è stato adottato il terreno di crescita WL agar con propionato di sodio e streptomina. Tecniche molecolari di PCR specie-specifica hanno confermato che la totalità delle colonie cresciute su maltosio-MRS apparteneva alla specie *Lactobacillus sanfranciscensis*. Per quanto riguarda i lieviti, la conta vitale ha portato allo sviluppo di due differenti tipologie di colonie che, sottoposte ad analisi PCR-RFLP dell'rITS con enzimi di restrizione *HaeIII* e *HinfI*, sono risultate appartenere a due diverse specie, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida milleri*. Nella "madre", il rapporto numerico tra batteri lattici e lieviti è risultato stabilmente pari a circa 10, valore significativamente più basso di quello generalmente riportato in letteratura come tipico per impasti acidi. Durante il processo di propagazione della "madre", consistente in 3 rinfreschi, il rapporto ha presentato una ulteriore diminuzione, fino a raggiungere valori inferiori all'unità nell'impasto finale. Conseguentemente, il quoziente di fermentazione (rapporto molare tra acido lattico ed acido acetico formati) ha presentato un andamento regolarmente decrescente nelle diverse fasi produttive, assumendo nell'impasto finale un valore di 1,6, pari a circa la metà di quello usualmente ritenuto come auspicabile per un impasto prima della cottura. La stabilità microbiologica della madre è risultata assicurata dalla procedura di mantenimento adottata.

I risultati sottolineano come le produzioni tradizionali a base di impasto acido possano essere caratterizzate da rapporti tra batteri e lieviti significativamente diversi da quelli comunemente riportati in letteratura.

Impasti acidi, *C. milleri*, *L. sanfranciscensis*, *S. cerevisiae*

STUDIO DEI CONSORZI MICROBICI DELLE PASTE ACIDE DELLA SARDEGNA: ASPETTI SENSORIALI E NUTRIZIONALI

M. Sanna, A. Marongiu, M. Budroni, F. Capobianco, M. Dettori, G. A. Farris

Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Sezione di Microbiologia Generale ed Applicata, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari, Italia

La pasta acida è caratterizzata dalla presenza di un consorzio microbico tra diverse specie di lievito e di batteri lattici. Le complesse interazioni che si stabiliscono tra questi microrganismi influenzano positivamente le caratteristiche sensoriali e nutrizionali del pane. Il presente lavoro di ricerca è stato articolato secondo tre diverse linee: 1) identificazione, caratterizzazione molecolare e tecnologica degli isolati da pasta acida, 2) valutazione degli aspetti nutrizionali del pane ottenuto con pasta acida, 3) analisi sensoriale del prodotto finito. L'identificazione e la caratterizzazione delle specie di lievito sono state effettuate sia tramite un approccio classico, previo isolamento e successiva caratterizzazione molecolare e tecnologica degli isolati, sia tramite l'analisi molecolare del DNA estratto direttamente da pasta acida. I primi risultati ottenuti dalla PCR-RFLP delle regioni ITS sembrerebbero confermare i dati ottenuti precedentemente sugli isolati in coltura pura. Da un punto di vista nutrizionale sono state analizzate le variazioni glicemiche postprandiali in soggetti normali, dopo ingestione di pane lievitato con pasta acida a confronto con un pane ottenuto con lievito di birra. L'ingestione del pane a pasta acida (8 ore di lievitazione) ha dato luogo ad una risposta glicemica inferiore, confortata da una risposta insulinemica significativamente più bassa, rispetto al pane prodotto con lievito di birra. Infine, il metodo triangolare, utilizzato per discriminare i 2 tipi di pane, ha dimostrato che esiste una differenza significativa tra il pane lievitato con pasta acida e quello ottenuto con il lievito di birra.

Pasta acida, PCR-RFLP, variazioni glicemiche, metodo triangolare

LIEVITI E BATTERI LATTICI NEGLI IMPASTI ACIDI DELLA REGIONE MARCHE

C. Garofalo, E. Zannini, A. Osimani, S. Santarelli, L. Aquilanti, F. Clementi

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Ancona.

La panificazione tradizionale, applicata alla produzione di diversi tipi di pane e altri prodotti da forno, si basa sull'utilizzo della "madre acida" detta anche "lievito naturale".

Nel nostro laboratorio stiamo lavorando da alcuni anni alla caratterizzazione della popolazione di batteri lattici e lieviti presenti negli impasti acidi marchigiani.

Le nostre ricerche hanno condotto all'isolamento di 116 lieviti e 117 batteri lattici da 10 campioni di impasti acidi provenienti da 8 panifici situati in diverse aree della regione Marche e di 167 batteri lattici da impasti di panettone e prodotti simili.

Gli isolati di batteri lattici da impasti di panificazione sono stati identificati mediante analisi ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) utilizzando un protocollo messo a punto nei nostri laboratori e confermati tramite sequenziamento. In totale sono state identificate 16 specie, tra cui, il gruppo dei *Lactobacillus plantarum* e *Lb. paralimentarius* sono risultati i maggiormente rappresentati.

Gli isolati di lievito sono stati identificati mediante analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphis*) e sequenziamento. I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza delle tre specie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida humilis* e *Clavispora lusitaniae*.

Alcuni isolati di batteri lattici e lieviti sono stati anche caratterizzati sulla base delle principali attività di interesse tecnologico. Fra questi, undici colture di lieviti e trentuno di batteri lattici identificate e scelte sulla base dell'attività fermentativa, sono state utilizzate per verificare la loro capacità di adattamento a lavorare in impasti contenenti farina d'orzo. La farina d'orzo presenta difficile panificabilità, ma, di contro, interessanti caratteristiche nutrizionali, grazie al considerevole livello di fibra solubile e di composti ad attività antiossidante (tocoferoli e tocotrienoli). Sono state quindi allestite tre tipologie di madri acide sperimentali con differenti percentuali di farina d'orzo (da sola o in miscela al 50% con farina di frumento) e con farina di frumento (controllo). Le tre tipologie di madri sono state rinfrescate per due mesi, alla fine dei quali è stata verificata la *performance* di lievitazione e la composizione della popolazione microbica direttamente via PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) o, indirettamente, mediante la determinazione del contenuto di acido acetico. L'incremento della concentrazione di acido acetico negli impasti contenenti farina d'orzo evidenzia una maggiore presenza di batteri eterolattici in queste matrici.

Anche gli impasti di panettone e prodotti simili sono stati sottoposti ad analisi PCR-DGGE delle popolazioni di batteri lattici e lieviti. I risultati, in fase di completamento, hanno evidenziato, fra i lieviti, la prevalenza di *Candida humilis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Madre acida, lieviti, batteri lattici, orzo.

Ricerca finanziata con contributo della Regione Marche (fondi di cui alla delibera CIPE n.20/2004)

POPOLAZIONI MICROBICHE E FORMAZIONE DI AMMINE BIOGENE IN SALAMI ARTIGIANALI DI CINTA SENESE

S. Guerrini, M. Carobbi, S. Mangani, M. Vincenzini

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze
P.le delle Cascine 24, 50144 Firenze, Tel.:+390553288309; Fax: +390553288272

Alimenti fermentati come i salami possono contenere ammine biogene (AB), composti tossici prodotti per decarbossilazione microbica di alcuni aminoacidi precursori. L'abbondanza di queste sostanze dipende sia dalla presenza di ceppi microbici capaci di produrre AB, sia dalla presenza degli aminoacidi precursori. In letteratura, è riportato come la carne di maiale appartenente alle razze rustiche si differenzi da quella delle razze selezionate per avere un maggior contenuto di grasso intramuscolare. Allo stesso tempo, è riportato anche come le razze autoctone possiedono una minore attività delle catepsine, enzimi proteolitici che possono favorire il rilascio di aminoacidi. Pertanto, allo scopo di verificare se la presenza di AB nei salami possa essere correlata con la tipologia di carne impiegata, nella presente sperimentazione è stato condotto uno studio su salami artigianali ottenuti da tre diverse razze di maiali: Cinta Senese (razza rustica) e Cinta Senese incrociata con razze selezionate quali Large White e Duroc. Ogni tipologia di maiale è stata allevata secondo due sistemi diversi: in stabulazione e *en-plan air*.

I risultati ottenuti hanno mostrato come, sebbene l'ecologia microbica delle fermentazioni saggiate fosse sostanzialmente analoga, i contenuti di AB finali fossero assai diversi e compresi tra 365 a 1423 mg/Kg. Uno screening qualitativo condotto per saggiare la capacità di produrre AB da parte degli isolati ottenuti dalla microflora naturale dei processi fermentativi presi in considerazione non ha mostrato differenze tali da giustificare contenuti finali di AB così diversi: in tutte le tipologie di salame, infatti, la percentuale di isolati produttori è risultata compresa tra il 70 e l'80%. La quantità di AB trovata al termine dei processi fermentativi si è dimostrata correlata con il grado di selezione delle razze di maiale impiegate: i salami ottenuti dalla lavorazione di carne proveniente da maiali autoctoni (Cinta Senese) o da maiali autoctoni incrociati con razze meno selezionate (Duroc x Cinta Senese) hanno mostrato un contenuto di AB mediamente minore rispetto a quelli prodotti con razze più selezionate (Large White x Cinta Senese). In particolare, la concentrazione di istamina, l'AB maggiormente responsabile di fenomeni di intossicazione, è risultata presente nel salame prodotto con la carne di Cinta Senese a concentrazioni significativamente più basse: 61 mg/Kg contro 200 e 302 mg/Kg rispettivamente riscontrati nei salami ottenuti con Duroc x Cinta Senese e Large White x Cinta Senese. Nessuna relazione è invece emersa tra tipologia di allevamento e contenuto finale di AB.

Ammine biogene, salame, attività decarbossilasica, Cinta Senese

STUDIO DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE DELLA “ SOPPRESSATA DEL VALLO DI DIANO”, UN INSACCATO CARNEO FERMENTATO DELLA CAMPANIA

F. Villani, D. Ercolini, A. Casaburi, C. Pennacchia, L. Filosa, F. Russo, G. Blaiotta

Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Sezione di Microbiologia Agraria, Alimentare e Ambientale e di Igiene – Stazione di Microbiologia Industriale

Sebbene molti insaccati fermentati siano ormai prodotti a livello industriale, in Italia esistono ancora delle regioni in cui questi alimenti sono preparati seguendo metodiche tradizionali, che non prevedono l'utilizzo di colture starter. In particolare, la Campania è una delle regioni in cui è possibile trovare ancora delle piccole aziende produttrici di un tipo di insaccato tradizionale denominato “soppresata”, molto apprezzato sul mercato locale per le sue peculiari caratteristiche organolettiche.

Lo studio dell'ecologia microbica di un prodotto fermentato è fondamentale per comprendere le specie realmente coinvolte nel processo fermentativo e per selezionare, nell'ambito di esse, gli specifici ceppi idonei alla formulazione di appropriate colture starter.

Il primo scopo del presente lavoro, pertanto, è stato quello di identificare le principali popolazioni microbiche presenti al termine del processo fermentativo in campioni di soppresata del Vallo di Diano, mediante l'applicazione della tecnica PCR-DGGE in associazione con metodiche classiche di conteggio microbico.

In tutti i campioni è stata osservata una netta dominanza di batteri lattici, compresi tra $1,4 \times 10^6$ e $3,2 \times 10^9$ UFC/g, e di stafilococchi, compresi tra $2,4 \times 10^4$ e $3,4 \times 10^7$ UFC/g. L'analisi PCR-DGGE è stata condotta attraverso estrazione diretta del DNA da ciascun campione alimentare e da bulk cellulari ottenuti raccogliendo l'intero contenuto delle piastre contabili impiegate per il conteggio delle differenti popolazioni microbiche. In seguito al sequenziamento dei frammenti DGGE, le specie rinvenute maggiormente sono state *Lactobacillus (L.) sakei* e *L. curvatus*, *Staphylococcus (S.) xylosus* e *S. saprophyticus*, *Enterococcus (E.) faecium* e *E. faecalis*. *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides* sono stati identificati nell'ambito della popolazione dei lieviti.

La strategia scelta ha favorito il riconoscimento delle principali specie microbiche ricorrenti al termine della maturazione delle soppresate che possono eventualmente essere isolate e selezionate come colture starter autoctone.

Pertanto, il secondo scopo è stato quello di caratterizzare e selezionare i diversi ceppi di *Staphylococcus xylosus* e *Lactobacillus* spp. isolati, sulla base delle più importanti caratteristiche tecnologiche, al fine di valutarne le performances tecnologiche come colture starter nella produzione delle soppresate del Vallo di Diano. Le attività tecnologiche degli isolati (attività proteolitica a carico delle proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari, lipolitica e nitrato reductasica) sono state valutate in presenza della microflora endogena, inoculando i singoli ceppi in studio direttamente in un impasto carneo per soppresata che veniva successivamente insaccato e stagionato per 15 giorni. I risultati ottenuti hanno evidenziato non solo, la capacità di alcuni ceppi di prendere il sopravvento sulla microflora autoctona ma soprattutto di esibire interessanti caratteristiche tecnologiche tali da renderli elegibili per la formulazione di colture starter autoctone.

Insaccati carnei fermentati; soppresata; colture starter; lattobacilli; stafilococchi.

Ringraziamenti: questo studio è stato finanziato dal MIUR, PRIN 2004.

ATTIVITÀ DELLA GLUTAMMATO DEIDROGENASI IN *LACTOBACILLUS* ISOLATO DA SALUMI ARTIGIANALI FERMENTATI

C. A. Fontana^{1,2}, G. M. Vignolo¹, P. S. Cocconcelli^{2,3}

¹Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), CONICET, Tucumán, Argentina.

²Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore, Cremona, Italy.

³Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy.

Il metabolismo microbico durante la maturazione dei salumi è essenziale per la produzione di aroma. Si conosce relativamente poco circa la capacità dei lattobacilli (LAB) delle carni di metabolizzare gli aminoacidi rilasciati che sono utilizzati come sorgente di energia dopo il consumo degli zuccheri. Il catabolismo degli aminoacidi da parte dei LAB inizia con la transaminazione ed i risultanti α -chetoadiacidi sono ulteriormente trasformati dagli enzimi o da reazioni chimiche. I ceppi di LAB che mostrano attività glutammato deidrogenasica (GDH) sono capaci di produrre α -chetoglutarico (α -KG) dall'acido glutammico (GDH) e perciò sono in grado di degradare gli aminoacidi in una reazione in terreno contenente acido glutammico. In questo studio si è ricercata la presenza di attività GDH in ceppi di *Lactobacillus* isolati da salumi fermentati artigianali. L'attività della GDH è stata trovata in ceppi di *L. sakei* (2/8) e in ceppi di *L. plantarum* (2/2). Si è visto che questa attività enzimatica è fortemente ceppo specifica e che i ceppi (GDH)+ mostrano differenti livelli di attività. Sono state eseguite reazioni di PCR per amplificare il gene *gdh* in *L. sakei*. La popolazione di *Lactobacillus gdh+* è stata ricercata per mezzo della PCR Real Time quantitativa (RT-PCR) nella popolazione di *Lactobacillus* sviluppata durante il processo di maturazione (14 giorni). Il numero totale di *Lactobacillus* e *Lactobacillus gdh+* è stato stimato comparando il valore *Ct* ottenuto con la rispettiva curva di taratura. Il numero totale di *Lactobacillus* stimato per mezzo della RT-PCR utilizzando primers genere specifici, è aumentato da 10^3 a 10^6 CFU/g in 5 giorni e questi valori sono rimasti stabili fino a 14 giorni. Il numero di *Lactobacillus gdh+* stimato con la RT-PCR amplificando il gene *gdh* ha mostrato lo stesso aumento di CFU/g quando è stato confrontato con la stima della popolazione totale di *Lactobacillus*, indicando perciò una selezione dei ceppi *gdh+* durante la maturazione. L'identificazione e selezione dei ceppi di *Lactobacillus* con alta attività *gdh* sarà applicata per la selezione delle colture starter per migliorare o intensificare la formazione di aroma durante la fermentazione dei salumi.

Salumi fermentati, aroma, glutammato deidrogenasi, *Lactobacillus sakei*

INDAGINE SULLA POPOLAZIONE MICROBICA DEL SALAME CIAUSCOLO MEDIANTE PCR-DGGE E REAL-TIME PCR

L. Aquilanti, S. Santarelli, G. Silvestri, A. Osimani, A. Beccaceci, F. Clementi

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche,
Via Brece Bianche, 60131 Ancona.

Il Ciauscolo è un salume fermentato della tradizione regionale italiana, originario dell'entroterra montuoso umbro-marchigiano, recentemente proposto per il riconoscimento della "Indicazione Geografica Protetta" (Gazzetta Ufficiale n. 64 del 17-3-2006). Le sue caratteristiche peculiari sono il colore rosato chiaro omogeneo e la spalmabilità, che derivano dall'elevato contenuto in grassi e dalle specifiche modalità di lavorazione, asciugatura e stagionatura.

La presente ricerca ha avuto il duplice obiettivo di identificare le specie microbiche coinvolte nel processo di maturazione e investigare le dinamiche di popolazione di batteri lattici e lieviti in questo salume fermentato, via PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Come alternativa alle tradizionali metodiche per l'enumerazione e l'identificazione di lattobacilli in insaccati fermentati, ulteriore obiettivo della ricerca è stato lo sviluppo di saggi di Real-Time PCR basati sull'utilizzo di coloranti e/o sonde fluorescenti.

Le analisi sono state condotte preliminarmente su 22 campioni di Ciauscolo pronto al consumo prelevati in salumifici delle province di Ancona, Macerata e Ascoli Piceno, di cui 14 a lavorazione artigianale e 8 a lavorazione industriale. La complessità della popolazione microbica di tali produzioni è stata investigata mediante PCR-DGGE. Dall'analisi dei *fingerprinting* molecolari, è emerso che le due specie lattiche *Lactobacillus sakei* e *Lb. curvatus* sono risultate le più rappresentate, mentre *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sono state individuate con frequenza minore. Tra i lieviti, la presenza della specie *Debaryomyces hansenii* è stata rilevata nell'80% dei campioni, mentre con minori frequenze sono state rilevate le specie *Candida psychrophila* e *Saccharomyces barnettii*.

Il grado di similarità dei campioni prodotti nelle differenti aree della regione Marche è stato determinato mediante analisi cluster dei *fingerprinting* molecolari ottenuti, utilizzando il coefficiente di similarità di Dice ed il metodo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA), mentre la biodiversità di ciascun campione è stata valutata calcolando l'indice di diversità di Shannon-Weaver.

La popolazione di lattici e lieviti di una delle 22 produzioni in esame è stata monitorata via PCR-DGGE, effettuando campionamenti, ad intervalli di tempo regolari, nel corso della maturazione. Dalle analisi è emerso che la complessità della popolazione lattica tende ad aumentare nel corso della maturazione, mentre la composizione della popolazione di lieviti rimane pressoché invariata.

Ciauscolo, PCR-DGGE, Real-Time PCR, batteri lattici, lieviti.

Ricerca finanziata con contributo PRIN-2004, Prot. 2004071270_005

CARATTERISTICHE FUNZIONALI DI DERIVATI LATTIERO-CASEARI

F. Minervini, C.G. Rizzello, M. De Angelis, R. Di Cagno e M. Gobbetti

Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

Un alimento è definito funzionale qualora, oltre alla funzione nutritiva, sia in grado di esplicare effetti positivi sulla salute e/o ridurre rischi di malattie. Il mercato degli alimenti funzionali è in continua espansione (www.rts-resource.com/StrategistIssue08.pdf) e nell'ultimo decennio la ricerca è stata attivamente impegnata nell'individuazione dei fondamenti scientifici a sostegno delle proprietà funzionali di alcuni alimenti, con particolare riferimento ai derivati lattiero-caseari. In questo ambito il Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata ha condotto alcuni studi (1, 2, 3, 4) sulle proprietà anti-ipertensive ed antimicrobiche di derivati lattiero-caseari. Na-caseinato ottenuto da latte di specie diverse (bovino, ovino, caprino, suino, bufala ed umano) è stato impiegato come substrato per la produzione di idrolizzati mediante una proteinasi parzialmente purificata di *Lactobacillus helveticus* (2). Frazioni caseiniche di latte di specie diverse hanno mostrato la presenza di sequenze fisiologicamente attive, in parte comuni, e criptate che, in seguito ad idrolisi, hanno generato biopeptidi ad attività ACE-inibitoria ed antibatterica. Alcuni dei peptidi identificati sono stati sintetizzati chimicamente e caratterizzati in relazione all'IC₅₀ ed alla resistenza ad ulteriore idrolisi ad opera di enzimi gastrici. Nove varietà di formaggi italiani, caratterizzate da differenze relative alla materia prima, tecnologia e tempo di maturazione, sono state usate come matrici per l'isolamento ed identificazione di peptidi ad attività antimicrobica (3, 4). I formaggi caratterizzati dal più intenso grado di proteolisi non hanno mostrato la presenza di biopeptidi, mentre altri (es. Pecorino Romano, Canestrato Pugliese) hanno accumulato peptidi ad attività antimicrobica con sequenze simili ai più potenti derivati proteici riportati in letteratura. I peptidi ad attività antimicrobica derivati dalle diverse frazioni caseiniche hanno mostrato caratteristiche anfipatiche, un elevato numero di residui aminoacidici basici ed un ampio spettro di azione nei confronti di batteri Gram-positivi e -negativi potenzialmente patogeni. Calcoli teorici basati sul rapporto N-solubile/N-totale dei formaggi oggetto di studio hanno evidenziato un contenuto di peptidi ad attività antimicrobica con potenziali effetti fisiologici.

Alimenti funzionali, peptidi bioattivi, attività antimicrobica

STUDIO DELLA VITALITÀ E COLTIVABILITÀ DELLA POPOLAZIONE MICROBICA PRESENTE NEI SIEROINNESTI NATURALI

B. Bottari¹, C. Lazzi¹, M. Santarelli¹, J. De Dea Lindner¹, M. Gatti¹, E. Neviani¹

¹Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione. Università degli Studi di Parma, via Usberti 11/A, 43100, Parma, Italia.

I sieroinnesti naturali sono colture naturali in siero di batteri lattici, ottenute dall'incubazione in condizioni termofile del siero dolce di fine caseificazione. Sono ecosistemi complessi caratterizzati dagli equilibri di specie e biotipi che si instaurano in seguito alle interazioni tra elementi microbiologici e tecnologici. Proprio per la variabilità delle colture naturali, la complessità biologica della popolazione microbica caratteristica dei sieroinnesti, nonostante i numerosi studi, non è stata ancora completamente compresa. L'isolamento e la coltivazione in terreno agarizzato, di norma utilizzate nelle analisi microbiologiche di queste matrici, consentono infatti di caratterizzare esclusivamente quella frazione di microrganismi in grado di crescere, moltiplicarsi e formare colonie nel mezzo colturale scelto, perdendo quindi le informazioni relative alla componente microbica che presenta una condizione fisiologica di vitalità in cui le cellule si mantengono metabolicamente attive pur avendo perso la capacità di duplicarsi. È stato dimostrato come i limiti legati alla coltivabilità microbica abbiano portato fino ad oggi alla rivelazione solo di parte della reale popolazione presente in ogni ecosistema. All'interno di questi esiste inoltre un'eterogeneità spazio-temporale dei microrganismi, associata anche al verificarsi di cambiamenti delle condizioni di stress (nutrienti, pH, temperatura, ma anche processi legati alla tecnologia di trasformazione), che inducono una continua variazione, sia qualitativa che quantitativa, delle comunità microbiche. Obiettivo di questo studio è stato valutare la coltivabilità dei microrganismi termofili dei sieroinnesti naturali freschi o in seguito all'applicazione di differenti condizioni di stress, differenziando, all'interno della popolazione microbica totale, la componente non vitale (NV) e quella vitale (V), diversamente coinvolte nell'acidificazione del siero e nelle successive prestazioni tecnologiche dello stesso. Sono stati analizzati 20 sieroinnesti utilizzati per la produzione di Grana Padano. I dati di coltivabilità sono stati valutati in diversi terreni di crescita, mentre lo studio di vitalità è stato effettuato mediante microscopia a fluorescenza, attraverso l'impiego di particolari fluorofori. La presenza di microflora che si adattano diversamente ai differenti substrati e che presentano quindi una differente capacità di crescita, è indice dell'elevata complessità dell'ecosistema del sieroinnesto naturale. È stato osservato come stress (es: da raffreddamento o congelamento) influiscano sulla popolazione microbica dal punto di vista quantitativo, riducendone parallelamente la vitalità e la coltivabilità, in modo più evidente per i lattobacilli rispetto ai cocchi.

Vitalità, coltivabilità, sieroinnesto

LA POPOLAZIONE LATTICA AUTOCTONA IN MOZZARELLA PRODOTTA NELLA REGIONE MARCHE

F. Ciarrocchi, A. Beccaceci, S. Santarelli, L. Aquilanti, F. Clementi

Dipartimento Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia

La mozzarella è un formaggio radicato nel territorio marchigiano e compreso nell'Elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali (DM 18 luglio 2000). Recentemente, tipicità e tradizionalità della Mozzarella Sibilla Stg, prodotta nella provincia di Ascoli Piceno, a partire da latte proveniente dall'area del Parco Nazionale dei Sibillini, sono state ufficialmente riconosciute dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (Reg. CEE 2082/92).

Obiettivo della presente ricerca è stato lo studio della popolazione lattica autoctona di Mozzarella prodotta, nella regione Marche, da latte crudo proveniente dall'entroterra montuoso.

A tale scopo, da un caseificio selezionato, sono stati prelevati campioni di latte crudo, cagliata e mozzarella, oltre che dello starter commerciale che veniva aggiunto al latte crudo in produzione. La campagna di isolamento da latte crudo, cagliata e mozzarella ha condotto all'ottenimento di 354 isolati Gram positivi e catalasi negativi, la cui identificazione, mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e sequenziamento di una porzione del gene per il 16S rRNA, ha evidenziato la presenza di una microflora autoctona estremamente biodiversa. In accordo con quanto osservato in altre produzioni di mozzarella al latte crudo della tradizione italiana, sono state identificate sia specie di interesse lattiero caseario, termofile (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lb. helveticus*) e mesofile (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lc.* subsp. *lactis*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei*), sia specie non utili per l'industria casearia (*Lc. garviae*, *Str. bovis*, *Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Weissella* spp.). La tipizzazione molecolare mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) dei 113 isolati ascritti a specie di interesse lattiero caseario (*Lb. helveticus*, *Str. thermophilus*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e subsp. *lactis*, *Lb. gasseri*, e *Lb. plantarum*) ha confermato l'eterogeneità della popolazione lattica autoctona caratteristica della produzione in studio, per la presenza di ceppi differenti all'interno della medesima specie. Questo risultato è stato ulteriormente confermato dai dati relativi alla caratterizzazione tecnologica, basata sulla valutazione della capacità acidificante in Skim milk di tali isolati ed espressa in termini di velocità ed intensità di acidificazione.

Mozzarella, LAB, ARDRA, RAPD, acidificazione.

CARATTERIZZAZIONE MICROBIOLOGICA, CHIMICO-FISICA, BIOCHIMICA E SENSORIALE DI FORMAGGI ITALIANI TIPICI E TRADIZIONALI

M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Gobbetti

Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

In letteratura sono abbastanza frequenti esempi di caratterizzazione dei formaggi che considerano aspetti di natura microbiologica, enzimatica, reologica o sensoriale. In un simile contesto è, probabilmente, difficile avere una visione di insieme della complessità del processo e dei rapporti di causa-effetto. Un approccio integrato per la caratterizzazione dei formaggi può, invece, contribuire alla completa valorizzazione dei prodotti ed alla comprensione delle dinamiche microbiche e biochimiche. Grazie alla collaborazione con diverse istituzioni straniere, il Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata ha condotto alcuni studi relativamente alla caratterizzazione microbiologica, chimico-fisica, biochimica e dei composti volatili di diversi formaggi italiani DOP e tradizionali (1, 2, 3, 4, 5). Tali studi hanno riguardato il Caciocavallo Pugliese (1), Canestrato Pugliese, Fiore Sardo, Pecorino Romano (2), nove Pecorini diversamente prodotti in Italia (4) e quattro formaggi maturati in condizioni non convenzionali (formaggi “barricati”) (5). L’applicazione di tecniche molecolari ha permesso l’identificazione dei componenti dominanti del microbiota, sia in termini di starter primari che di batteri lattici non-starter. In particolare, è stata confermata la capacità di crescita, nelle condizioni ostili della cagliata in fase di maturazione, di specie quali *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*. L’uso di tecniche cromatografiche ed elettroforetiche ha permesso una completa caratterizzazione degli eventi di proteolisi primaria e secondaria, i quali sono risultati in grado di differenziare le produzioni. Analogamente, i formaggi di tipo Pecorino e “barricati” sono stati caratterizzati da un livello di lipolisi proporzionale al tempo di maturazione e variabile in funzione delle diverse opzioni tecnologiche. L’uso di tecniche PTI e SPME/GC ha permesso la caratterizzazione di un numero molto elevato di composti volatili da riferire principalmente alle classi chimiche degli esteri, chetoni, aldeidi, alcoli, lattoni e terpeni. In accordo con le più recenti acquisizioni che dimostrano come il profilo sensoriale dei formaggi sia determinato da eventi che interessano il catabolismo degli aminoacidi, ciascun formaggio, anche all’interno della stessa varietà, ha mostrato profili distintivi dei composti volatili, da imputare al tipo di alimentazione animale, alla tecnologia ed alla specie/biotipo di batteri selezionati durante la fase di maturazione.

Formaggi, batteri lattici, proteolisi, lipolisi, composti volatili

STUDIO PRELIMINARE SULLA BIODIVERSITÀ MICROBICA DEL LATTE DI CAPRA

F. Fancello, N.P. Mangia, M.A. Murgia, P. Deiana

Dipartimento di Scienze Ambientali Agrarie e Biotecnologie Agroalimentari, Sezione di Microbiologia Generale ed Applicata, Università degli Studi di Sassari, Viale Italia 39, 07100 Sassari

Il latte prodotto dagli allevamenti caprini, presenti nelle aree montane marginali, viene conferito ai caseifici, e solo in minima parte trasformato in azienda. Il miglioramento delle condizioni dell'allevamento e l'applicazione di processi di trasformazione innovativi per l'ottenimento di prodotti di alto valore biologico, diventano indispensabili per la valorizzazione del territorio e il miglioramento delle condizioni socio economiche di queste aree. Il miglioramento della qualità e la garanzia della salubrità delle produzioni casearie non può prescindere dalla conoscenza della microflora presente nel latte e derivati. È pertanto fondamentale impiegare i microrganismi più rispondenti per poter gestire gli equilibri enzimatici che si evolvono nei processi maturativi.

Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la composizione microbica di campioni di latte di capra provenienti da aziende ubicate in diversi aree dell'isola, scelte in base al tipo di allevamento (estensivo, intensivo o semintensivo) e alla razza allevata.

I risultati preliminari su 14 campioni hanno messo in evidenza un complesso quadro microbico, dove il gruppo predominante è risultato quello dei lattococchi mesofili e degli enterococchi con 4.56 e 4.25 log ufc/ml di latte rispettivamente. Il numero dei lattobacilli mesofili è risultato mediamente molto esiguo, 3.26 log ufc/ml, e nella metà dei campioni analizzati, questo gruppo è risultato assente. Sono stati isolati e classificati in base ai loro caratteri morfologici e fenotipici un totale di 79 ceppi appartenenti alle specie: *Lactococcus lactis* (20 ceppi), *Enterococcus faecalis* (16), *Enterococcus faecium* (13), *Streptococcus* spp. (10), *Lactobacillus casei* (13) e *Lactobacillus plantarum* (7). Il numero dei coliformi totali e fecali, è risultato molto variabile e strettamente legato alle condizioni dell'allevamento e al management, mentre la presenza di *Escherichia coli* è stata riscontrata solo in due campioni.

Latte di capra, biodiversità, lattococchi mesofili.

EVOLUZIONE DELLA MICROFLORA SUPERFICIALE NEL FORMAGGIO FONTINA DOP E SUA INFLUENZA SULLA MATURAZIONE: PRIME ACQUISIZIONI.

R. Ambrosoli*, P. Dolci*, G. Zeppa*, A. Barmaz**, S. Zenato**

* DIVAPRA, Microbiologia e Industrie agrarie, Università degli Studi di Torino

** IAR, Institut Agricole Régional, Aosta.

E' stato intrapreso uno studio microbiologico, tecnologico e sensoriale per identificare i diversi componenti della microflora superficiale del formaggio Fontina, seguendone l'evoluzione qualitativa e quantitativa durante la stagionatura, allo scopo di valutare la loro influenza sulla formazione della crosta e l'effetto di questa sulla maturazione della pasta.

Sono state prese in considerazione forme prodotte in tre diversi caseifici valdostani (Montfleury, Villeneuve, Pollein), salate in salamoia o a secco, e fatte stagionare in tre magazzini diversi (Pré-Saint-Didier, Saint-Christophe, Ollomont). Su di esse sono stati effettuati campionamenti della microflora superficiale all'atto della caseificazione e successivamente a 7, 14, 28, 56 e 84 giorni di stagionatura.

I risultati finora ottenuti hanno evidenziato una microflora costituita principalmente da batteri corineformi (cariche massime intorno a 10^{10} cfu/g) e in minore misura da micrococchi, batteri lattici e lieviti (cariche massime mediamente intorno a 10^9 cfu/g). Gli enterococchi che, come noto, giocano un ruolo fondamentale nella maturazione della pasta della Fontina, hanno presentato cariche superficiali non superiori a 10^6 cfu/g. Sia pur con differenze legate al luogo di produzione e di stagionatura, questi gruppi microbici hanno manifestato un aumento progressivo nel corso della stagionatura, ad eccezione dei batteri corineformi, che dopo un incremento iniziale sono andati incontro a un calo verso la fine del periodo considerato.

I dati relativi alle cariche microbiche sono stati sottoposti a trattamento statistico per valutare l'influenza del luogo di produzione e di stagionatura. L'analisi di cluster ha messo in evidenza una maggiore influenza del fattore magazzino. Infatti, le cariche relative alle diverse produzioni clusterizzano tra loro a seconda del magazzino in cui le forme sono messe a stagionare.

Dall'Analisi delle Componenti Principali è inoltre emerso che le cariche ottenute dai formaggi provenienti dal caseificio Montfleury formano un gruppo che si distingue nettamente da quello dei formaggi prodotti negli altri caseifici. Ciò potrebbe essere in relazione con la qualità del latte, che nel caso in questione proviene da un'unica stalla ed è particolarmente paucimicrobico. Viceversa, non è stato osservato alcun effetto dovuto alla diversa modalità di salatura.

Allo stato attuale della ricerca l'identificazione genetica mediante RSA e PCR specie-specifica degli isolati appartenenti al gruppo degli enterococchi ha evidenziato la predominanza delle specie *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*. Tra i lieviti, identificati mediante il sistema API 20 C AUX, ha prevalso la specie *Candida famata*.

Microflora superficiale, Fontina DOP, stagionatura

PROTEOMICA DEI BATTERI LATTICI DELL'INDUSTRIA LATTIERO-CASEARIA

M. De Angelis, R. Di Cagno, M. Gobbetti

Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari

L'analisi del proteoma consente una visione dinamica delle variazioni fenotipiche durante la vita microbica e può essere usata per comparare i livelli di espressione proteica di microrganismi sottoposti a diversi stress ambientali. L'uso dei batteri lattici nel settore lattiero-caseario determina risposte di adattamento dalle quali discendono variazioni delle performance applicative. Il Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata ha condotto alcuni studi (1, 2, 3) sulla proteomica dei batteri lattici che hanno permesso di spiegare ed ottimizzare l'uso di microrganismi starter e non-starter nei processi di caseificazione.

La risposta allo stress da alte temperature è stata studiata in *Lactobacillus helveticus* durante la propagazione in siero comparando la crescita in gradiente termico (55 – 20°C) con quella a temperatura fissa (42°C). L'analisi mediante elettroforesi bidimensionale ha evidenziato una induzione, in molti casi transitoria, dei livelli di espressione di ca. 50 proteine durante le diverse fasi del gradiente di temperatura. La maggior parte delle proteine ha manifestato un incremento dei livelli di espressione durante l'intervallo di temperatura 55 – 40°C. Le proteine identificate mediante sequenziamento N-terminale ed analisi MALDI-TOF sono coinvolte in diverse funzioni fisiologiche: (i) proteine da stress (es. DnaK, GroEL); (ii) proteine coinvolte nel processo glicolitico (es. enolasi, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi); e (iii) proteine con attività regolatrice (es. proteasi ATP dipendente, DNA-binding protein II). In generale, le attività enzimatiche di tipo proteinasi e peptidasi di *Lb. helveticus* sono risultate più elevate in cellule raccolte a 40°C durante il gradiente di temperatura. Lo studio ha permesso di dimostrare che la popolazione microbica risultante dalla propagazione in gradiente di temperatura esplica diverse risposte ambientali che mutano in funzione del decremento di temperatura. Le più marcate manifestazioni fenotipiche funzionali all'uso di *Lb. helveticus* come starter primario si osservano a temperature $\geq 40^\circ\text{C}$.

La risposta allo stress da alte temperature è stata studiata anche in *Lactobacillus plantarum*, uno dei più diffusi batteri lattici non starter che popola la cagliata durante la fase di maturazione. La resistenza ai trattamenti di pastorizzazione è dipesa dallo stato fisiologico delle cellule (fase esponenziale o stazionaria), dal pre-adattamento allo stress termico (42°C per 1 h) ed, in generale, cellule non coltivabili dopo il trattamento di pastorizzazione hanno recuperato la capacità di moltiplicazione durante l'incubazione a 7°C per 20 gg. Come dimostrato da analisi elettroforetiche bidimensionali e successiva determinazione delle sequenze N-terminali, cellule pre-adattate sono state caratterizzate da un incremento dei livelli di espressione di proteine coinvolte nell'attività di chaperonine, stabilità e funzione dei ribosomi, "temperature-sensing" e "stringent response mediation". Lo studio dei meccanismi fisiologici di risposta alla pastorizzazione è di fondamentale importanza per la sopravvivenza di *Lb. plantarum* nei processi di caseificazione.

Proteomica, batteri lattici, elettroforesi bidimensionale

MODIFICAZIONE DEL METABOLISMO DI ALCUNI BATTERI LATTICI SARTER E NON STARTER MEDIANTE PRETRATTAMENTO CON ALTA PRESSIONE DI OMOGENEIZZAZIONE

L. Iucci, F. Patrignani, P. Saracino, R. Lanciotti, M. E. Guerzoni

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Bologna, Piazza Goidanich, 60, 47023, Cesena

Le principali applicazioni biotecnologiche delle alte pressioni di omogeneizzazione riguardano la distruzione su larga scala dei microrganismi, anche per il recupero di metaboliti ed enzimi intracellulari, e l'attivazione o la disattivazione di enzimi. In particolare sono ben documentati sia l'incremento di efficacia di molecole antimicrobiche naturalmente presenti negli alimenti quali lisozima, lactoferrina e lactoperossidasi che la modificazione dell'attività di enzimi coinvolti nella maturazione dei formaggi (plasmina, lipasi endogene) a seguito di trattamenti a 100-200 MPa. Anche la capacità delle alte pressioni di omogeneizzazione di modulare l'attività enzimatica e fermentativa di alcuni microrganismi starter e non starter, appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus arizonensis*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus sanfransiscensis*, è riportata in letteratura. La lisi dei batteri lattici ed il rilascio di enzimi intracellulari sono fattori determinanti nella maturazione dei formaggi. Le alte pressioni di omogeneizzazione possono influenzare l'integrità cellulare ed il rilascio di enzimi intracellulari così come l'attività di enzimi rilasciati nelle matrici o associati agli involucri cellulari.

Pertanto il principale obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare le potenzialità di questa tecnologia come strumento per controllare le cinetiche di fermentazione e modificare i profili metabolici delle cellule di batteri lattici trattate nonché aumentare il rilascio di enzimi proteolitici localizzati nel citoplasma e modificare l'attività di quelli extracellulari o legati alla parete. In particolare sono stati considerati gli effetti di un pre-trattamento singolo o ripetuto a 50, 100 e 150 MPa su vitalità, cinetica di fermentazione, produzione di acidi e metaboliti volatili di diversi ceppi appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus arizonensis* e *Lactobacillus pentosus*. Inoltre è stato valutato l'effetto dei pre-trattamenti applicati sull'attività proteolitica dei surnatanti delle cellule trattate nei confronti di α e β -caseina nonché sulle caratteristiche reologiche dei coaguli ottenuti. I risultati raggiunti hanno evidenziato che le risposte al processo applicato variano con la specie e le caratteristiche individuali dei ceppi. In generale, un pre-trattamento delle cellule a 100 MPa non riduce significativamente la vitalità ma ha un marcato effetto sulle attività enzimatiche e sul metabolismo dei microrganismi inoculati in latte con conseguenti modificazioni delle caratteristiche sensoriali dei coaguli.

Alte Pressioni di Omogeneizzazione, attività proteolitica, batteri lattici

STUDIO MEDIANTE L'APPROCCIO "PHENOTYPE MICROARRAYS - BIOLOG" DEI MECCANISMI COINVOLTI NELLA RESISTENZA BATTERICA AL CROMATO

C. Viti, F. Decorosi, E. Tatti, L. Giovannetti

Il compito del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie all'interno del progetto "Iniziativa di collaudo e trasferimento di tecniche idonee per l'impiego del compost di qualità in agricoltura" è quello di approfondire le conoscenze sull'effetto del compost di qualità su alcuni gruppi microbici fondamentali per lo sviluppo e la produttività della pianta nonché per la fertilità del suolo: i microrganismi PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) e i funghi micorrizici. Lo studio è stato condotto su piante di mais, vite ed olivo.

I risultati ottenuti dopo il primo anno di sperimentazione su mais, presentati in dettaglio durante il seminario "iniziative di trasferimento e collaudo di tecniche idonee per l'impiego di compost di qualità in agricoltura" tenutosi il 25 febbraio 2005 a Firenze, hanno messo in evidenza per quanto riguarda i funghi micorrizici, appartenenti essenzialmente al genere *Glomus*, che:

- la distribuzione del compost non ha alterato le popolazioni micorriziche dei campioni di mais trattato con compost rispetto a quelle individuate in campioni di mais condotto in modo tradizionale (concimazione chimica);
- l'analisi delle popolazioni spongine del mais coltivato in una azienda biologica ha evidenziato che l'uso di compost ha portato allo sviluppo di popolazioni micorriziche differenti (maggiore biodiversità) da quelle riscontrate utilizzando stallatico di cavallo (tradizionalmente impiegato). Tuttavia non vi sono state differenze nella densità spongina e nella percentuale di infezioni micorriziche tra le due tesi.

I dati relativi alla caratterizzazione, per la presenza di caratteri PGPR, di 2500 ceppi batterici, isolati dalla rizosfera del mais coltivato nelle due aziende oggetto della sperimentazione, indicano che il compost ha portato:

- ad una diminuzione dei batteri Gram-negativi nella rizosfera del mais trattato con compost. Tale diminuzione probabilmente è dovuta sia all'apporto di batteri Gram-positivi con il compost sia ad un aumento di batteri Gram-positivi dovuto all'aggiunta nel suolo di sostanze organiche complesse.
- ad un aumento dei batteri eterotrofi coltivabili produttori di siderofori. La maggiore presenza di batteri produttori di siderofori nella rizosfera di mais trattato con compost costituisce un fattore importante poiché sono considerati antagonisti di microrganismi fitopatogeni.

L'analisi degli altri parametri indagati non ha evidenziato cambiamenti statisticamente significativi tra le popolazioni rizosferiche di mais trattato con compost e non trattato.

I dati acquisiti nel secondo anno, completi al momento solo per quanto riguarda la caratterizzazione delle comunità micorriziche di vite ed olivo, suggeriscono una limitata influenza del compost di qualità su tali popolazioni microbiche. Una valutazione complessiva potrà essere fornita solamente quando tutti i dati conseguiti saranno stati analizzati.

IMPIEGO DI LH-(RT)PCR PER LO STUDIO DI POPOLAZIONI MICROBICHE COMPLESSE.

M. Santarelli¹, C. Lazzi¹, B. Bottari¹, V. Bernini¹, M. Gatti¹, E. Neviani¹

¹Dipartimento di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione. Università degli Studi di Parma, Via Usberti 11/A, 43100 Parma.

Il sieroinnesto naturale usato per la produzione del formaggio Grana Padano è un'associazione microbica complessa di batteri lattici (LAB). Il metodo di preparazione del sieroinnesto, prevedendo l'incubazione del siero residuo della caseificazione del giorno precedente ad una temperatura gradualmente decrescente, determina lo sviluppo di un elevato numero di LAB termofili vitali. La microflora caratteristica del sieroinnesto è costituita principalmente da lattobacilli termofili omofermentanti e da una minoranza di lattobacilli eterofermentanti e *Streptococcus thermophilus*. Le principali specie ritrovate sono *Lactobacillus helveticus*, che si presenta come la specie dominante, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum* e *Streptococcus thermophilus*.

Length heterogeneity-(Reverse transcriptase)PCR (LH-RT-PCR) è una tecnica che permette di individuare i microrganismi vitali secondo variazioni naturali nella lunghezza delle sequenze di 16S rRNA risalendo alle percentuali relative delle sequenze amplificate originate dai diversi microrganismi. Questa tecnica fornisce una rapida rappresentazione della comunità microbica prescindendo dalle normali procedure di isolamento previste nella microbiologia classica.

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare la ripetibilità della tecnica LH-(RT)PCR per lo studio di popolazioni microbiche complesse come il sieroinnesto naturale per formaggio Grana Padano; è stata inoltre analizzata la popolazione microbica caratteristica dei sieroinnesti naturali, provenienti da diversi caseifici, e la modificazione della stessa dopo programmate variazioni di temperatura. La conoscenza dell'effetto prodotto dalle diverse temperature applicate permette di capire le interazioni tra i batteri lattici che si verificano durante la conservazione del sieroinnesto ed il processo di produzione. I risultati raggiunti hanno consentito di confermare che *Lactobacillus helveticus* è la specie maggioritaria, seguita da *Lact. delbrueckii subsp. lactis* e *Streptococcus thermophilus*. Tutte le specie hanno mostrato una bassa sensibilità al raffreddamento, mentre sia il congelamento che il trattamento di cottura hanno portato a cambiamenti significativi nella composizione relativa delle specie presenti.

Ecosistema microbico complesso, sieroinnesto naturale, batteri lattici, Length heterogeneity-(RT)PCR.

VALUTAZIONE MEDIANTE METODI MOLECOLARI DELL'ANDAMENTO DI POPOLAZIONI DI LIEVITO IN VINACCE DESTINATE ALLA PRODUZIONE DI GRAPPA

B. Bovo¹, C. Andrichetto², M. Bernardini¹, M. Carlot³, R. Filippini¹, A. Lombardi², A. Giacomini^{1,3}, V. Corich^{1,3}

¹Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Padova, Legnaro (PD), Italy. ²Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Thiene (VI), Italy.

³Università di Padova, sede di Conegliano Veneto (TV), Italy.

La Grappa è una tipica bevanda alcolica italiana ottenuta dalla distillazione delle vinacce. Una fase importante del processo di produzione è l'insilamento temporaneo delle vinacce che permette ai lieviti residenti di trasformare gli zuccheri residui in alcol. Questo studio ha avuto lo scopo di monitorare le dinamiche della microflora di lieviti naturalmente presenti durante il periodo di stoccaggio, per identificare le specie microbiche presenti, con particolare attenzione al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* le cui attività metaboliche sono in grado di influenzare la qualità del prodotto finale. Le vinacce provenienti da uva Moscato e da uva Prosecco sono state stoccate separatamente e campionate all'inizio dell'insilamento (T0), dopo 4 (T1), e dopo 15 giorni (TF) rispettivamente. La popolazione di lieviti è stata valutata utilizzando il metodo convenzionale della conta su piastra e l'identificazione a livello di specie è stata ottenuta tramite l'analisi molecolare delle Sequenze Internamente Trascritte (ITS) e il sequenziamento della regione D1/D2 dell'RNA ribosomale. Un'ulteriore caratterizzazione di ceppi appartenenti al gruppo *Saccharomyces sensu stricto* è stata ottenuta mediante l'analisi del DNA mitocondriale. E' stato rilevato un alto livello di biodiversità all'inizio del periodo di stoccaggio: alcune specie, come *Hanseniaspora guillermondi* e *Metschnikowia pulcherrima* sono comuni ad entrambi i tipi di vinaccia mentre altre sono state trovate esclusivamente in uno dei due ambienti. *Saccharomyces cerevisiae*, non presente al tempo T0, è diventato la specie dominante nei campionamenti T1 e TF, richiamando dinamiche simili a quelle dei mosti in fermentazione. Per valutare la composizione della popolazione di *Saccharomyces* a livello di ceppo nelle due matrici sono stati esaminati 300 isolati. E' stato osservato un alto grado di biodiversità nella vinaccia di Moscato, dove sono stati identificati 64 diversi profili elettroforetici e non è stato individuato nessun ceppo nettamente dominante, contrariamente a ciò che è stato rilevato in Prosecco, con 22 profili discriminati, di cui uno è presente ad una frequenza pari al 67% degli isolati al tempo T1 e mentre al TF decresce al 35%.

UTILIZZAZIONE ALTERNATIVA DELLA METODICA BIOLOG PER LA VALUTAZIONE DELLA CONTAMINAZIONE MICROBICA IN ORTAGGI DI IV GAMMA

R. Ambrosoli*, J.L. Minati*, P. Gay**, C. Tortia**, B. Dal Bello*

* DIVAPRA, Microbiologia e Industrie agrarie, Università degli Studi di Torino

** DEIAFA, Meccanica agraria, Università degli Studi di Torino

La metodica Biolog è basata essenzialmente sulla valutazione simultanea dell'entità dell'attacco microbico a carico di molteplici fonti di carbonio, attraverso la lettura spettrofotometrica delle variazioni cromatiche indotte dall'attività dei microrganismi su di un indicatore Redox (violetto di tetrazolio) aggiunto a ogni singolo composto nei pozzetti di una piastra tipo Eliza. Tali letture sono gestite per mezzo di un software apposito e possono essere agevolmente sottoposte a vari tipi di trattamento statistico per la loro interpretazione.

Poiché l'evoluzione del colore nei pozzetti è l'effetto dell'attività microbica, le letture spettrofotometriche possono essere usate come indicatore delle variazioni quanti-qualitative della popolazione microbica presente in una certa matrice, per esempio in materiale alimentare del quale si debba valutare la stabilità microbiologica in varie condizioni di conservazione. E' così possibile seguire, a intervalli prestabiliti, l'evoluzione microbica durante un certo periodo di tempo, con il vantaggio di un'immediata acquisizione del risultato, senza l'attesa del tempo di incubazione previsto dalle tecniche tradizionali di conteggio.

Nella presente ricerca, tale approccio è stato applicato per valutare l'evoluzione della contaminazione microbica in insalata di IV gamma variamente confezionata e conservata. A tal fine colture pure (isolate dai campioni in studio) e popolazioni miste (estratte nel corso della conservazione) sono state inoculate a diverse concentrazioni in piastre standard Biolog Eco-Micro Plates. Queste sono state incubate e l'evoluzione media del colore durante l'incubazione, accertata mediante successive letture spettrofotometriche, è stata espressa come AWCD (*Average Well Color Development*). Le curve AWCD corrispondenti a ciascun inoculo sono state rappresentate matematicamente con un modello a crescita limitata, come proposto da Lindstrom (1997). Si è proceduto quindi a identificare i parametri coinvolti nella relazione tra l'entità dell'inoculo e l'andamento dell'AWCD, nonché a verificare l'idoneità del modello matematico ottenuto in vista della sua applicazione a studi di microbiologia predittiva e valutazione di *shelf-life*.

Metodica Biolog, contaminazione microbica, modellazione matematica

SVILUPPO DI UN METODO Q-PCR PER LA RILEVAZIONE, IDENTIFICAZIONE, QUANTIFICAZIONE E DEFINIZIONE DELLA VITALITÀ DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN ALIMENTI

L. Cocolin, K. Rantsiou, R. Urso, G. Comi

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Università degli studi di Udine, via Marangoni 97, 33100 UDINE

Listeria monocytogenes è ampiamente riconosciuto come microrganismo patogeno per l'uomo trasmissibile con il consumo di alimenti contaminati. I cibi che più frequentemente sono stati ritenuti responsabili dell'insorgenza delle patologie legate a *L. monocytogenes* sono rappresentati da prodotti carnei, latte crudo e formaggi a breve stagionatura. In questo lavoro si è sviluppato un protocollo basato sulla PCR quantitativa (Q-PCR) per l'identificazione, la quantificazione e la valutazione della vitalità di cellule di *L. monocytogenes* presenti negli alimenti. La metodica si basa sull'amplificazione di un frammento di circa 100 bp della regione intergenica tra i geni 16S rRNA e 23S rRNA. Si sono sviluppati una coppia di primer ed una sonda Taqman (marcata con FAM), in grado di amplificare in maniera specifica solo ed esclusivamente *L. monocytogenes* e tale specificità è stata validata su un panel di 100 ceppi di *Listeria* spp. e non-*Listeria* spp. Curve di calibrazione costruite a partire da diluizioni scalari di DNA ed RNA e da diluizioni decimali di cellule di *L. monocytogenes* hanno mostrato un range di linearità superiore a 6 ordini di grandezza con dei coefficienti di correlazione superiori allo 0.9. Inoltre le efficienze di amplificazione sono risultate essere prossime al 100%. Ulteriormente si è valutata la possibilità di rilevare *L. monocytogenes* direttamente in alimenti e senza alcun arricchimento. Tale step ha previsto un'inoculo di diluizioni scalari di *L. monocytogenes* in carne macinata, estrazione del DNA e dell'RNA e Q-PCR. Il protocollo si è dimostrato poco sensibile in campioni alimentari, in quanto il limite di sensibilità è stato determinato in 10^5 unità formanti colonia (ufc)/g di prodotto. Per questo motivo, al fine di rilevare quantità inferiori di cellule, si è provveduto ad un arricchimento selettivo overnight, dopo il quale si è provveduto ad un'amplificazione specifica con il protocollo ottimizzato. In tali condizioni il limite di sensibilità è stato di 10-100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

Listeria monocytogenes, PCR quantitativa, rilevazione specifica, metodica coltura-indipendente.

Il presente lavoro è stato finanziato dalla Commissione Europea con contratto n. PF-FOODCT-2005-007081, "Pathogen Combat: control and prevention of emerging and future pathogens at cellular and molecular level throughout the food chain".

ACIDO RESISTENZA DI *BIFIDOBACTERIUM* SPP.: STRATEGIE PER INCREMENTARE LA SOPRAVVIVENZA AL TRANSITO GASTRICO

M. Modesto¹, F.Gaggia¹, S. Allesina², M. Barba², F. Deidda², P. Lorenzini², G.P. Strozzi²

¹DiSTA Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università degli Studi di Bologna

²Probiotal, Gruppo Mofin Alce, Viale Custodi 12 Novara

Bifidobatteri e Batteri Acido Lattici sono considerati batteri probiotici in grado di influenzare positivamente composizione ed attività metabolica della microflora intestinale dell'ospite.

L'effetto probiotico è legato alla capacità del batterio di rimanere vitale sino al sito di colonizzazione, superando le barriere delle secrezioni gastriche e biliari.

L'acidità è dunque una condizione ambientale normale per un batterio probiotico ed è inoltre il criterio che guida la selezione di nuovi ceppi.

La vitalità osservata è influenzata da diversi fattori: i valori di pH ma anche i tempi di esposizione, il ceppo e la specie utilizzati.

E' stata testata la tolleranza ad ambiente acido di 12 ceppi di bifidobatteri, selezionati tra le quattro specie *B. breve*, *B. choerinum*, *B. suis* e *B. animalis* subsp. *lactis*, di differenti origini (suino, uomo, coniglio, pollo e yogurt), per un loro potenziale uso come probiotici nell'alimentazione animale.

Dopo due ore di esposizione a 8 diversi intervalli di pH (da 2.5 a 6.0), tutti i ceppi testati mostrano una vitalità cellulare conservata, rispetto alla popolazione inoculata a t_0 maggiore del 90% per tutti i valori di pH ≥ 3.0 .

A pH 2.5 la resistenza si rivela invece ceppo specifica: i tre ceppi di *B. choerinum* e solo due dei tre ceppi di *B. animalis* subsp. *lactis* conservano più del 90% di vitalità dopo due ore. Dei 3 ceppi di *B. suis* testati solo due tollerano bene l'esposizione, l'ultimo è invece sensibile come i tre ceppi di *B. breve*: meno del 20% di vitalità conservata.

I profili di resistenza ottenuti *in vitro* possono essere garantiti anche *in vivo* utilizzando tecniche di microincapsulazione del probiotico.

Si definiscono le matrici più idonee a conservare la vitalità del probiotico durante il transito gastrico nel rispetto della sicurezza del consumatore finale.

Probiotici, bifidobatteri, acido resistenza, microincapsulazione.

Ringraziamenti: Si ringrazia la Comunità Europea per il Finanziamento al Progetto "Quality low input Food"

METODI MOLECOLARI PER LA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI FERMENTATI

L. Rizzotti, M. Marzotto, D. Simeoni, E. Guglielmini, F. La Gioia, F. Dellaglio

Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università di Verona, Strade Le Grazie 15, 37134 Verona. E-mail: franco.dellaglio@univr.it

La sicurezza microbiologica è un requisito fondamentale di ogni prodotto alimentare e l'attenzione verso questo aspetto è sempre maggiore sia da parte dei consumatori che delle aziende produttrici. L'assenza di microrganismi patogeni, delle loro tossine e di tratti indesiderati come l'antibiotico-resistenza trasferibile e la produzione di ammine biogene sono elementi essenziali per garantire la qualità igienica di un alimento.

I metodi convenzionali utilizzati per l'analisi degli alimenti presentano spesso dei limiti relativi alla loro laboriosità e, in alcuni casi, ad una ridotta sensibilità. Sviluppi nel campo della biologia molecolare hanno messo a disposizione nuovi strumenti che consentono il rilevamento di patogeni e di geni specifici anche direttamente dall'alimento senza previo isolamento dei microrganismi. In questo contesto metodiche basate sull'amplificazione e sull'ibridazione del DNA possono essere impiegate per la valutazione della sicurezza alimentare; infatti, sono in grado di fornire risultati precisi in tempi più rapidi, sono maggiormente sensibili e indipendenti dallo stato fisiologico dei microrganismi.

Tra gli studi attualmente in corso, la tecnica Real-Time PCR è stata applicata alla ricerca di batteri patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* in alimenti come formaggi e salami, approfondendo inoltre l'analisi della presenza dei geni codificanti per le enterotossine di *S. aureus*. Per quanto riguarda il rilevamento dell'antibiotico-resistenza e del rischio correlato, la PCR gene-specifica è stata utilizzata per indagare la diffusione dei principali determinanti genici in diverse specie batteriche presenti in alimenti fermentati di largo consumo (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* spp.). Infine, la presenza e l'espressione dei geni coinvolti nella produzione delle ammine biogene, composti tossici derivanti dal metabolismo di diversi generi batterici in matrici alimentari, è stata studiata mediante la Reverse Transcriptase Real-Time PCR.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'applicazione di questi metodi è in grado di fornire dati affidabili sulla presenza dei fattori di rischio considerati in diverse tipologie di campioni e può costituire un valido supporto per la valutazione della sicurezza nella filiera di produzione degli alimenti fermentati.

Patogeni alimentari, antibiotico resistenze, ammine biogene, alimenti fermentati, metodi molecolari

UTILIZZO DI PCR-DGGE PER LO STUDIO DELL'ECOLOGIA MICROBICA IN ALIMENTI

E. Bearzi, R. Urso, K. Rantsiou, G. Comi, L. Cocolin

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Università degli studi di Udine, via Marangoni 97, 33100 UDINE

In diverse occasioni è stato dimostrato come le ecologie microbiche di sistemi complessi, come gli alimenti, risultano diverse se determinate con metodiche basate sulla coltivazione microbica o no. In particolare è accettato scientificamente che durante arricchimenti selettivi o elettivi, alcune specie prendono il sopravvento su quelle in condizioni stressate o danneggiate, o presenti in numero minore. Per questo motivo, l'uso di metodi coltura indipendenti ha assunto sempre più importanza negli ultimi anni. Una delle metodiche più utilizzate a questo fine è rappresentato dalla Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), estensivamente applicata al settore alimentare.

In questo studio si è voluto determinare quale tra le metodiche DGGE già proposte e pubblicate può risultare ottimale per lo studio dell'ecologia microbica in alimenti. A questo scopo 9 coppie di primer sono stati testati su un panel di 11 specie microbiche comunemente isolate da alimenti. Solo quelle in grado di amplificare tutti i ceppi considerati sono state successivamente utilizzate nell'analisi DGGE. Le concentrazioni di denaturante ed il voltaggio e la lunghezza della corsa elettroforetica sono state cambiate al fine di rendere massima la differenziazione dei ceppi testati e solo 4 coppie si sono dimostrate ottimali a questo fine. Quando le metodiche selezionate sono state utilizzate per lo studio delle ecologie microbiche di alimenti carnei e di prodotti lattiero caseari, solo una coppia di primer si è dimostrata utile per rilevare la maggior parte delle specie microbiche presenti nel campione in esame, in quanto i gel risultanti hanno mostrato un numero più elevato di bande rispetto a quelli prodotti con le altre coppie di primer usate in questo studio. I risultati ottenuti dallo studio dell'ecologia microbica degli alimenti testati è stato evidenziato come prodotti freschi erano caratterizzati da una biodiversità più ampia, rispetto ad alimenti fermentati o processati.

DGGE, metodica coltura-indipendente, ecologia microbica.

Il presente lavoro è stato finanziato dalla Commissione Europea con contratto n. PF-FOODCT-2005-007081, "Pathogen Combat: control and prevention of emerging and future pathogens at cellular and molecular level throughout the food chain" .

DIFFUSIONE DI GENI PER LA TETRACICLINA RESISTENZA IN *LACTOBACILLUS*

D. Zonenschain, E. Guglielmetti, L. Morelli

Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Via Emilia Parmense, 84.
29100 Piacenza.

La problematica dell'antibiotico resistenza costituisce un argomento di crescente interesse per la salute dell'uomo, poiché sempre più diffusa anche in batteri che svolgono un ruolo primario nella produzione di alimenti fermentati. L'antibiotico resistenza in questi batteri può diventare un problema in caso siano possibili scambi del materiale genetico, responsabile per la resistenza stessa, con batteri patogeni.

L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare la diffusione di antibiotico resistenze in batteri utilizzati per la produzione di salumi tipici e a denominazione protetta della provincia di Piacenza.

A tale scopo sono stati analizzati ceppi del genere *Lactobacillus* isolati lungo tutta la filiera produttiva di salami e dal prodotto pronto al consumo. L'antibiotico preso in considerazione è la tetraciclina utilizzata in ragione di 16µg/ml nelle piastre di isolamento.

I ceppi isolati sono stati identificati a livello di specie mediante ARDRA-PCR dopo averli divisi in gruppi secondo i profili ottenuti mediante Rep-PCR. Gli isolati batterici tetraciclina resistenti identificati sono stati *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus* e *L. paracasei*.

L'espressione fenotipica è stata valutata con il metodo delle microdiluzione in brodo, in accordo con gli standard NCCLS, per la determinazione delle MICs (Minimum Inhibitory Concentration). Una volta certi della caratterizzazione fenotipica dell'antibiotico resistenza, considerando resistenti tutti i ceppi con MIC uguale o superiore a 64 µg/ml, si è proceduto alla ricerca delle determinanti genetiche mediante PCR. I primer utilizzati al momento consentono di mettere in evidenza i geni per *tet M*, *tet S* e *tet W*.

Il numero di ceppi risultati essere positivi alle 3 coppie di primer utilizzati si equivalgono. Sicuramente *tet M* è risultato essere presenti in ceppi che appartengono ad un maggior numero di specie. Infatti, *tet M* è stato trovato in ceppi di *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. reuteri*, *L. paracasei*, mentre *tet S* in *L. plantarum*, *L. reuteri* e *L. amylovorus* e *tet W* in *L. reuteri*, *L. johnsonii* e *L. brevis*.

I nostri risultati concordano con quelli riportati in letteratura per quello che riguarda la diffusione di *tet M*. Si procederà in futuro ad utilizzare altre coppie di primer per mettere in evidenza le determinanti genetiche in quei ceppi risultati fino ad ora negativi in PCR a qualsiasi set di oligonucleotidi.

Salame, *Lactobacillus*, tetraciclina, antibiotico-resistenza

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL GENE CODIFICANTE PER LA TIROSINA DECARBOSSILASI (TD) IN *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

G. Spano, F. Lamacchia, D. Fiocco, L. Beneduce, S. Massa

Le ammine biogene (AB) sono delle sostanze vasoattive in grado di esplicare la loro azione tossica anche sul sistema nervoso centrale. Esse si originano dai corrispondenti amminoacidi precursori in seguito a processi di decarbossilazione enzimatica e possono raggiungere concentrazioni elevate in alimenti a matrice proteica che vanno incontro a lunghi periodi di stoccaggio e/o processi fermentativi (insaccati, prodotti ittici, formaggi, bevande fermentate) (1,5,6). Si originano generalmente come risultato della normale attività microbica attraverso reazioni di decarbossilazione di amminoacidi secondo la reazione: $R \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH} = R \cdot \text{CH}_2 \text{NH}_2 + \text{CO}_2$. Le monoamine istamina (HI), tiramine (TY) e triptamina (TR) e le diamine putrescina (PUT) e cadaverine (CAD) sono formate dagli amminoacidi istidina, tirosina, triptofano, ornitina e lisina, rispettivamente. Inoltre, la putrescina è un precursore delle poliammine spermidina (SPD) e spermina (SPM) (3,4). Le BA possono essere degradate come risultato di reazioni di deaminazione ossidativa ad opera di microrganismi aventi attività ammino ossidasica (2). L'ingestione di cibi contenenti dosi relativamente alte di AB, in particolare istamina e tiramina, due delle principali ammine biogene studiate, è responsabile di effetti tossicologici dovuti alle loro proprietà vasoattive e psicoattive (1).

In questo lavoro vengono presentati i primi risultati riguardanti la identificazione, caratterizzazione ed analisi funzionale di un gene codificante per l'enzima tirosina decarbossilasi (TD), identificato in alcuni ceppi di *Lactobacillus plantarum* isolati da mosti in fermentazione. Il gene TD, identificato mediante utilizzo di oligonucleotidi degeneri, è probabilmente veicolato da elementi mobili.

TIPIZZAZIONE GENETICA DI LIEVITI CONTAMINANTI LATTI FERMENTATI

A. Ribecchi, M. L. Callegari

Centro Ricerche Biotecnologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore di Cremona, Via Milano 24, 26100 Cremona-Italy

Nel presente lavoro si sono isolati ed identificati geneticamente lieviti inquinanti in 15 campioni di yogurt alla frutta. Lieviti contaminanti sono inoltre stati isolati ed identificati in 15 semilavorati di frutta utilizzati come ingredienti per la produzione dei corrispettivi yogurt. Dai 30 campioni totali (15 campioni di yogurt e 15 di semilavorati di frutta corrispondenti) sono stati isolate 300 colonie che sono state tipizzate mediante la tecnica PCR-RFLP del DNA mitocondriale. Le 10 colonie isolate da ogni campione di yogurt e di semilavorato mostravano lo stesso profilo di restrizione, indicando che tutti gli isolati appartenevano allo stesso ceppo.

Grazie a questo primo pre-screening delle colonie è stato possibile prendere in considerazione per ogni campione analizzato un ceppo rappresentativo da sottoporre all'identificazione della specie mediante l'analisi del 5.8 rDNA e delle due regioni adiacenti (ITS1 e ITS2). I prodotti di PCR (ITS1-ITS4) ottenuti da 600-800 bp, sono stati digeriti con cinque enzimi di restrizione *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *HpaI*, e *Hpa II*. Questa tecnica ha consentito di identificare i 30 ceppi presi in esame come appartenenti alle specie *Pichia anomala* (10 ceppi), *Pichia guilliermondii* (4), *Saccharomyces cerevisiae* (4), *Issatchenkia orientalis* (4), *Candida lusitanae* (2), *Candida tropicalis* (2) e *Torulasporea delbrueckii* (2). Per due ceppi è stato possibile stabilire che appartenevano al genere *Candida* senza però riuscire a determinarne la specie. I risultati dell'identificazione dei 30 isolati, ottenuti con la tecnica PCR-RFLP sono stati confermati mediante il sequenziamento della regione delimitata dai primer ITS1-ITS4. Le analisi delle sequenze hanno confermato in tutti i casi l'identificazione ottenuta mediante tecnica PCR-RFLP.

Poiché in tutti i casi i ceppi isolati dallo yogurt erano uguali a quelli isolati dal semilavorato di frutta corrispondente, è stato possibile dimostrare che la fonte di contaminazione dello yogurt è risultata essere sempre il semilavorato di frutta e che la specie più rappresentata era *Pichia anomala*.

Questo studio mostra come metodi molecolari di identificazione e tipizzazione dei lieviti possono essere utilizzati per determinare la fonte di inquinamento di lattici fermentati e per seguire l'intera filiera produttiva allo scopo di risolvere problemi nel controllo qualità.

Lieviti, yogurt, MtDNA-RFLP, ITS- RFLP

I GENI CODIFICANTI PER “SMALL HEAT SHOCK PROTEINS” SONO ESSENZIALI PER LA CRESCITA DI *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

U. Della Vella, D. Fiocco, A. Vernile, S. Massa, G. Spano

La risposta agli stress abiotici da parte di organismi vegetali o animali, viene spesso accompagnata dalla induzione e sintesi di proteine da stress ad alto (115-60 kDa) e basso (15-30 kDa) peso molecolare note come proteine “heat shock” (HSP). Alcune di queste proteine sono stress-specifiche, ma molte sono inducibili da stress diversi. Inoltre, alcune proteine da stress (ad esempio DnaK e GroEL) sono costitutive e la loro sintesi è incrementata dallo stress. Altre proteine sono invece neosintetizzate in risposta ad uno stress. L’espressione di geni *hsp* in condizioni normali lascerebbe supporre una loro funzione non confinata esclusivamente agli stress. Per identificare una eventuale funzione costitutiva di geni *hsp*, abbiamo costruito dei mutanti di “knock out” di *Lactobacillus plantarum* mediante inserzione del gene *cat* nella regione codificante di tre geni appartenenti ad una stessa famiglia codificante per delle “small heat shock proteins” (shsp). Questi geni erano stati precedentemente caratterizzati ed isolati da *Lactobacillus plantarum* (1,2). Il vettore utilizzato per l’ottenimento dei mutanti è un vettore “killer” derivato da *Escherichia coli*. Per tale scopo, le regioni 5’ e 3’ adiacenti ai geni in esame (lunghe circa 1.5 kb) sono state inizialmente amplificate da DNA genomico isolato da *L. plantarum* mediante degli oligonucleotidi sintetici. Tali regioni sono state successivamente fuse alle estremità 5’ e 3’ del gene *cat* (responsabile della resistenza all’antibiotico cloramfenicolo). Le cassette di “knock out” così ottenute sono state utilizzate per trasformare, mediante elettroporazione, *L. plantarum*. Sono stati isolati, su terreno contenente cloramfenicolo, alcuni cloni positivi che sono stati analizzati per la tolleranza agli stress. I ceppi trasformati di *L. plantarum* hanno mostrato non solo una ridotta tolleranza agli stress, ma anche una forte riduzione della crescita rispetto ai controlli non trasformati, a tutte le temperature utilizzate.

TRASFERIMENTO CONIUGATIVO DI ERITROMICINA-RESISTENZA DA *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* A *LISTERIA* SPP.

L. Tosi, G. Berruti, L. Morelli

Università Cattolica del Sacro Cuore-Istituto di Microbiologia. Via Emilia Parmense 84,
29100 Piacenza.

Nove ceppi di *Streptococcus thermophilus* isolati da prodotti lattiero caseari e aventi le determinanti genetiche di antibiotico resistenza *ermB* e *tetS*, responsabili della resistenza agli antibiotici Eritromicina e Tetraciclina rispettivamente, sono stati studiati al fine di stabilire la locazione di suddetti geni e verificarne il trasferimento intra ed inter specie.

Il trasferimento orizzontale dei geni di antibiotico resistenza è stato studiato adottando la tecnica della coniugazione in piastra usando come riceventi un ceppo mutante streptomina e rifampicina resistente del genere *S. thermophilus* (LMG18311) per il quale l'intero genoma è stato completamente sequenziato (accession number CP000023), e il ceppo di *Listeria innocua* DSM 20649.

In particolare, il ceppo di *S. thermophilus* E18 è stato capace di trasferire *ermB* nei ceppi riceventi di *S. thermophilus* LMG 18311 e *Listeria innocua* DSM20649 alle frequenze di 3×10^{-7} e 5×10^{-9} .

Il trasferimento di *tetS* non è stato rilevato.

Le analisi effettuate con tecnica PFGE sui ceppi transconiuganti hanno messo in evidenza che il gene *ermB* è localizzato all'interno di un elemento trasponibile di approssimativamente 40kb che può integrarsi nel cromosoma del ceppo ricevente oppure essere presente exciso dal cromosoma probabilmente come intermedio circolare.

Si è verificato inoltre che l'inserzione di tale elemento nel genoma dei ceppi di *S. thermophilus* riceventi avviene di preferenza su particolari frammenti di restrizione; in particolare, un frammento di 37500bp ottenuto dalla digestione del cromosoma del ceppo di *S. thermophilus* LMG8311, è il principale target del processo di inserzione. Dalla completa sequenza genomica del ceppo LMG18311, disponibile su Gene Bank, si è evinto che tale frammento di restrizione non contiene nessuna sequenza di inserzione.

Attraverso tecniche di PCR invertita è stato possibile ottenere e sequenziare 13kb dell'elemento trasponibile di approssimativamente 40kb in totale, portante il gene *ermB*; le successive analisi di sequenza hanno dimostrato una elevata omologia con il plasmide *pRE25* rilevato in *Enterococcus faecalis*.

Streptococcus thermophilus, coniugazione, antibiotico resistenza, sicurezza alimentare.

Ruolo della microbiologia nei settori agro-alimentare ed ambientale

INDICE DEGLI AUTORI

A		Canganella F.	23, 55
		Capece A.	15, 71, 80
		Capobianco F.	83
Al lesina S.	102	Cappa F.	50
Alfano G.	17, 48	Cappitelli F.	41, 47
Altieri C.	51, 59, 64	Cardillo D.	59
Ambrosoli R.	21, 94, 100	Carlot M.	74, 99
Anastasio M.	49	Carobbi M.	82, 85
Andreoni V.	36, 38	Casaburi A.	25, 86
Andrighetto C.	99	Casella S.	20
Angelozzi D.	67	Castaldi P.	39
Aponte M.	25	Castioni A.	29
Aquilanti L.	11, 34, 84, 88, 91	Cavalca L.	36
Arizon J.	37	Chaves-Lopez C.	52, 57
Augruso S.	68	Chiurazzi M.	25, 37
B		Ciafardini G.	45
Baldin R.	74	Ciani M.	11, 33, 34, 56, 72, 82
Balsamo R.	54	Ciarrocchi F.	91
Barba M.	102	Cibelli F.	64
Barberio C.	35	Cioccia G.	45
Barnaz A.	94	Civilini M.	21, 42
Basaglia M.	20	Clementi F.	11, 34, 84, 88, 91
Bassi N.	44	Cocconcelli P.S.	50, 53, 66, 87
Bassler B.	30	Coci M.	21
Bearzi E.	105	Cocolin L.	101, 104
Beccaceci A.	88, 91	Colombo M.	36, 38
Belletti N.	65	Comi G.	101, 104
Belli C.	17, 48	Comitini F.	34, 56, 81
Bellina E.	22	Corbo M.R.	45
Beneduce L.	107	Corich V.	74, 99
Bernardini M.	99	Corsetti A.	28
Bernasconi S.	36	Corte L.	26
Bernini V.	14, 98	Crippa L.	38
Berruti G.G.	60, 109	Cubaiu L.	69
Bertin L.	35	D	
Bevilacqua A.	46, 58	D'Aimmo M.R.	24, 54
Bianchi L.	43	Daffonchio D.	19
Biavati B.	24, 53, 56	Dal Bello B.	100
Biondi N.	18	Dazzo F.B.	20
Blaiotta G.	49, 86	De Angelis M.	12, 89, 92, 95
Bonanomi G.	37	De Bertoldi M.	22
Bonatti M.	27	De Bortoli E.	74
Borin S.	19	De Dea Lindner J.	14, 90
Bosi P.	24, 53	De Ingenis J.	62
Bottari B.	90, 98	De Philippis R.	43
Bovo B.	99	Decorosi F.	97
Brandolini V.	73	Deiana P.	39, 103
Brughieri D.	34	Deidda F.	102
Brusa T.	19	Del Gallo M.	30, 40
Brusetti L.	19	Del Sorbo G.	37
Budroni M.	16	Dell'Amico E.	36, 39
Buscioni G.	69	Della Vella D.	108
C		Dellaglio F.	103
Cacchio P.	30, 40	Di Cagno R.	12, 89, 92, 95
Callegari M.L.	107	Di Gioia D.	35
		Di Mattia E.	23, 55
		Di Pasqua R.	65

Dolci P.	61, 94	Lepidi A.	40
Domizio P.	63, 72	Lombardi A.	74, 99
E		Lorenzini P.	102
Ercole C.	30, 40	Lustrato G.	17, 70
Ercolini D.	86	M	
F		Maietti A.	73
Fancello F.	103	Mangani S.	85
Farris G.A.	16, 69, 76, 83	Mangia N.P.	93
Faticenti F.	26	Mannazzu I.	11, 56, 62, 67
Fava F.	35	Mannelli F.	43
Federle M.	30	Marongiu A.	83
Felis G.E.	29	Marzotto M.	103
Fianchetti F.	29	Massa S.	13, 106, 108
Filippini R.	99	Mazzoni M.	24, 54
Fiocco D.	13, 106, 109	Melis P.	39
Fiore C.	71, 73	Minati J.L.	100
Foiani S.	38	Minervini F.	12, 89
Fontana C.	53, 86	Modesto M.	24, 54, 102
Franceschini N.	40	Morelli L.	60, 105, 109
G		Moschetti G.	25, 37
Gaggia F.	57, 102	Murgia M.A.	93
Gannucci D.	75	N	
Garau G.	39	Nannelli F.	79
Garofano C.	84	Nardi T.	74
Gasbarri R.	57	Ndagijimana M.	78
Gatti M.	14, 90, 98	Neviani E.	14, 90, 98
Gay P.	100	O	
Gazzola S.	53, 66	Orro D.	69
Giacomini A.	74, 99	Osimani A.	84, 88
Giovanetti L.	97	Ozino O.I.	61
Giovani G.	79	P	
Giussani B.	41	Palomba S.	49
Gobbetti M.	12, 89, 92, 95	Paolillo S.	75
Gorra R.	21	Paparella A.	57
Granchi L.	68, 75	Patrignani F.	65, 78, 96
Guerrini S.	82, 85	Pennacchia C.	86
Guerzoni M.E.	78, 96	Pepe O.	49
Guglielmetti E.	105	Pilosa L.	86
Guglielmini E.	103	Pinna C.	76
I		Politi H.	67
Iacumin L.	65	Polone E.	20
Iucci L.	96	Pozo M.C.	63
L		Principi P.	41, 47
La Gioia F.	103	R	
Laanbroek H.J.	21	Raffaelli N.	62
Ladu G.	69	Ranalli G.	17, 48, 70
Lamacchia F.	106	Rantsiou K.	101, 104
Lanciotti R.	78, 96	Rellini P.	26
Lazzi C.	14, 90, 98	Ribecchi A.	107
Lencioni L.	63, 72	Rizzello C.G.	12, 89

Rizzotti L. 103
 Rodolfi L. 18, 44
 Romaniello R. 71, 77, 80
 Romano P. 15, 71, 76, 77, 80
 Rosi I. 79
 Rossi F. 29
 Russo F. 86

S

Sacchi R. 25
 Sanna M. 83
 Sannino L. 49
 Santarelli M. 90, 98
 Santarelli S. 84, 88, 91
 Saracino P. 78, 96
 Scala F. 37
 Schirone M. 52
 Sciubba L. 35
 Scolari G. 27
 Serafino V. 15, 71, 80
 Serio A. 52, 57
 Settanni L. 28
 Silvestri G. 88
 Simeoni D. 103
 Sinigaglia M. 46, 51, 59, 64
 Sorlini C. 41, 47
 Spano G. 13, 106, 108
 Speranza B. 51
 Squartini A. 20
 Stefanini I. 24, 54
 Stringini M. 81
 Strozzi G.P. 102
 Suzzi G. 28, 52, 57

T

Taccari M. 33, 34
 Tannini E. 84
 Tatti E. 97
 Tedeschi P. 73
 Tegli S. 63, 72

Tittarelli C. 24, 54
 Tofalo R. 52
 Torriani S. 29
 Tortia C. 100
 Tosi L. 60, 109
 Travisi P. 24, 54
 Tredici M.R. 18, 44

U

Urso R. 101, 104

V

Vallicelli M. 78
 Van Vuuren H.J.J. 16
 Vannini L. 78
 Ventorino V. 25, 37
 Ventura M. 14
 Vernile A. 13, 108
 Vernocchi P. 78
 Vescovo M. 27
 Vignozzi P. 63, 72
 Villa F. 41
 Villani F. 86
 Vincenzini M. 68, 75, 82, 85
 Viti C. 97

Z

Zaccheo P. 38
 Zacconi C. 27
 Zanardini E. 41
 Zanini K. 29
 Zara G. 16, 69, 76
 Zara S. 16, 69, 76
 Zennato S. 94
 Zeppa G. 94
 Zilio F. 74
 Zonenschain D. 105
 Zullo B.A. 45