

# IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE E BIOTIPIZZAZIONE GENOTIPICA DELLA MICROFLORA AUTOCTONA DEL CIAUSCOLO: STUDIO PRELIMINARE

## *MOLECULAR IDENTIFICATION AND GENOTYPING OF CIAUSCOLO AUTOCHTHONOUS MICROFLORA: PRELIMINARY STUDY*

Petruzzelli A.<sup>1</sup>, Ciarrocchi F.<sup>2</sup>, Foglini M.<sup>1</sup>, Fisichella S.<sup>1</sup>, Sebastiani C.<sup>1</sup>, Baffone W.<sup>2</sup>, Santarelli S.<sup>3</sup>, Tonucci F.<sup>1</sup>, Blasi G.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Perugia.

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università degli studi di Urbino “Carlo Bo” – Urbino.

<sup>3</sup>Dipartimento SAIFET, Università Politecnica delle Marche – Ancona

### SUMMARY

The present study reports the results of a preliminary characterization of the bacterial population of Ciauscolo, a typical Italian fermented sausage, traditionally manufactured in Marche region. The bacterial community involved in Ciauscolo fermentation was investigated using both molecular and culture-based methods. The estimation of genotypic intra-species variation of the autochthonous bacteria isolated was also evaluated by using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and unweighted pairgroup method with arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis. Our findings revealed an high diversity of the autochthonous bacterial population investigated, both at species and strain level.

### KEYWORDS

Ciauscolo, autochthonous bacteria, RAPD.

Il Ciauscolo è un insaccato fermentato originario del territorio marchigiano la cui plurisecolare produzione è ampiamente documentata. Tale prodotto, già incluso nell'elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali (2000), ha recentemente ottenuto il riconoscimento di Indicazione Geografica Protetta (11 agosto 2009). Costituito esclusivamente da carne suina, il Ciauscolo si contraddistingue per l'elevata spalmabilità dovuta al contenuto in grassi dell'impasto e alle specifiche modalità di lavorazione, asciugatura, maturazione, stagionatura direttamente riconducibili alla tradizione e all'ambiente geografico e climatico omogeneo. A differenza di altri prodotti carnei fermentati, nel processo di lavorazione del Ciauscolo, in genere, non vengono impiegate colture starter. Lo studio della popolazione microbica autoctona di tale prodotto, è indispensabile per la definizione delle caratteristiche sensoriali e di tipicità dello

stesso ma anche per poter selezionare specie potenzialmente utilizzabili nella formulazione di colture starter in grado di garantire un naturale controllo dei requisiti igienico-sanitari del prodotto senza alterarne le caratteristiche peculiari. In questo lavoro vengono presentati i risultati preliminari di un'indagine finalizzata alla valutazione della biodiversità microbica del Ciauscolo mediante identificazione e tipizzazione dei microrganismi responsabili del processo di maturazione. Il campionamento è stato effettuato presso un salumificio della provincia di Ascoli Piceno su 3 lotti di lavorazione a vari stadi di maturazione (24 h, 48 h, 5 gg, 10 gg, 30 gg, 40 gg). Ciascun campione è stato sottoposto ad analisi microbiologiche convenzionali per la conta e l'isolamento di: (I) lattobacilli (MRS, 37°C per 72 h in anaerobiosi), (II) cocchi mesofili (M17, 30°C per 48 h), (III) enterococchi (SBA, 37°C per 48 h), (IV) *Staphylococcus aureus* (BP RFP, 37°C per 48 h). L'identificazione genotipica

della flora microbica autoctona è stata effettuata su 159 isolati mediante metodo ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e successiva conferma tramite sequenziamento di una porzione di 360 bp del gene per il 16S rDNA. La tipizzazione genotipica con analisi RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) è stata condotta solo su alcune specie di interesse (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lb. sakei* e *Lb. plantarum*) utilizzando i primer D8635 e 5'-AGC AGC GTG G-3'. I profili elettroforetici ottenuti mediante analisi RAPD sono stati convertiti in una matrice binaria (0 = assenza e 1 = presenza di banda) sulla base della quale è stata successivamente calcolata una matrice di similarità. L'analisi cluster è stata effettuata utilizzando il metodo Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) ed il software NTSYS, versione 1.8, fissando arbitrariamente una soglia di similarità pari a 80 %. L'identificazione molecolare con metodica ARDRA ha permesso di individuare una popolazione batterica autoctona eterogenea costituita da 14 specie batteriche. Tra quelle ascrivibili al gruppo dei batteri lattici, *P. pentosaceus* è risultata la specie dominante (31 isolati) (~ 32 %), seguita da *Lb. plantarum* (13 isolati) (~ 13 %), *Lb. sakei* (11 isolati) (~ 11 %) ed in quantità minore da *Lc. lactis*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii*, *Lc. garviae*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. coryniformis* ssp. *torquens*, *Lb. reuteri*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Tra i cocchi coagulasi negativi è stata identificata la specie *Staphylococcus saprophyticus* ssp. *saprophyticus* mentre tra gli enterococchi è stata identificata la sola specie *Enterococcus faecalis*. *S. aureus* è risultata l'unica specie presente tra gli stafilococchi coagulasi positivi. Infine per cinque isolati è stato possibile giungere alla sola definizione del genere (*Enterococcus* sp., *Carnobacterium* sp., *Lactococcus* sp). La popolazione batterica isolata nel Ciauscolo è sostanzialmente analoga a quella riscontrata in altri prodotti carnei a fermentazione spontanea. Notevole interesse va rivolto alle specie appartenenti al genere *Lactobacillus*. Ad esso infatti appartengono gran parte dei ceppi batterici con una dimostrata efficacia probiotica e sicurezza d'uso utilizzati nella formulazione di starter microbici funzionali (Linee Guida del Ministero della Salute). La presenza di *Lb. plantarum* e *Lb. sakei* risulta significativa per il contributo che

tali specie hanno nella definizione delle proprietà organolettiche dei prodotti fermentati e per la capacità di alcuni ceppi di produrre batteriocine attive contro *Listeria* sp. Infine la presenza della specie *E. faecalis* potrebbe essere associata ad una contaminazione durante il processo di macellazione e sezionamento e alla capacità di tali microrganismi di crescere ad elevate concentrazioni saline, ad alte temperature ed a bassi valori di pH. La biotipizzazione mediante RAPD ha permesso di individuare diversi livelli di eterogeneità genetiche all'interno delle singole specie considerate. In particolare la clusterizzazione ha permesso di distinguere 8 genotipi per *P. pentosaceus*, 6 genotipi per *Lb. plantarum*, 8 genotipi per *Lb. sakei* e 2 per *Lc. lactis*. L'eterogeneità intraspecifica riscontrata è indice di una elevata biodiversità nella popolazione batterica autoctona, dovuta probabilmente agli ingredienti utilizzati e alla tecnica di produzione artigianale strettamente legata al territorio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucl Acid Research* 20, 5137-5142.
2. Cocconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L (1995). Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett Appl Microbiol*, 21, 376-379.
3. Dice LR (1945). Measures of the amount of the ecologic association between species. *Ecology* 26, 297-302.
4. Sokal RR, Sneath PHA (1963). Principle of numerical taxonomy, 181-185. Freeman, San Francisco, California.
5. L. Aquilanti, S. Santarelli, G. Silvestri, A. Osimani, A. Petruzzelli, F. Clementi. 2007 The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 120(1-2):136-145.
6. G. Silvestri, S. Santarelli, L. Aquilanti, A. Beccaceci, A. Osimani, F. Tonucci, F. Clementi. 2007. The microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Science*. 77 (3) 413-423.

*Prove eseguite nell'ambito del progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute: "Studio della flora autoctona nella bioconservazione degli alimenti: caratterizzazione di ceppi isolati in prodotti tradizionali della Regione Marche" (RC IZSUM 05/2007).*