

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

FACOLTÀ DI AGRARIA

**CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI PER LA
RISTORAZIONE**

RIASSUNTO DELLA RELAZIONE FINALE:

**APPROCCI MOLECOLARI PER LA RILEVAZIONE DI
CLADOSPORIUM HERBARUM SU CROSTE DI FONTINA**

CANDIDATO:

BENEDETTA PERRONE

RELATORE:

PROF. LUCA SIMONE COCOLIN

CORRELATORE:

DOTT.SSA KALLIOPI RANTSIOU

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

L'applicazione della biologia molecolare alla ricerca di microrganismi trova un'implementazione importante nella garanzia della sicurezza igienico – sanitaria degli alimenti. Le metodiche molecolari costituiscono una risorsa notevole, poichè rispetto a quelle tradizionali basate sulla crescita in piastra di microrganismi isolati da ecosistemi naturali, permettono una individuazione rapida e più affidabile. Tra gli ecosistemi alimentari considerati maggiormente a rischio, nella scelta dell'oggetto analitico del metodo, si è considerato che le croste dei formaggi che subiscono una stagionatura più o meno lunga costituiscono substrati ideali per l'attacco di microrganismi, in particolare delle muffe. Nell'ambito dei formaggi, la necessità dello sviluppo della metodica è nata ed è stata influenzata dalla richiesta di produttori valdostani di Fontina, i quali, accertata la frequente presenza di *Cladosporium herbarum* sulle croste, necessitavano di un sistema di analisi veloce per la rilevazione della muffa.

C. herbarum è responsabile di diverse alterazioni sulle croste di Fontina, riconducibili a variazioni dell'odore (pungenza), variazioni della consistenza (granulosità) e variazioni del colore (presenza del micelio scuro).

Le contaminazioni derivano esclusivamente dall'ambiente di stagionatura, costituito da grotte naturali caratterizzate da un ambiente molto umido, sulle cui pareti *C. herbarum* cresce con facilità. La costruzione del metodo sviluppa il suo primo passo nella verifica della specificità di primers che erano stati precedentemente utilizzati per la rilevazione di *C. herbarum* in campionamenti ambientali, ma mai applicati agli alimenti. Per questo motivo è stato necessario modificare le condizioni dei cicli PCR in modo da ottenere un'amplificazione specifica. I DNA target sono stati estratti e purificati a partire da colture di collezione già identificate e da colture isolate da croste di Fontina. Dai DNA ottenuti dalle croste di Fontina, in parallelo, si è voluto determinare quali sono le muffe che insieme con *C. herbarum*, popolano frequentemente questo ecosistema. L'analisi è stata condotta tramite sequenziamento dopo DGGE e purificazione del DNA.

Verificata la specificità dei primers ed individuato il ciclo che ottimizza le condizioni di reazione, il passo successivo per lo sviluppo della metodica di PCR quantitativa, è stato quello di individuare una curva di taratura che permettesse la correlazione fra i segnali di fluorescenza ottenuti e la concentrazione iniziale delle spore. *C. herbarum* si è dimostrato una muffa che non gradisce crescere su terreni di coltura solidi; per questo motivo non è stata possibile la sua conta in piastra.

L'unica alternativa alla conta in piastra, è stato l'utilizzo di una conta delle spore al microscopio con la camera di Burker.

Lo sviluppo della metodica di PCR quantitativa rappresenta una risorsa rapida messa a disposizione dei laboratori di analisi che permette l'identificazione e la quantificazione di *C. herbarum* in poche ore, ovvero il tempo necessario a condurre diluizione ed omogeneizzazione dei campioni di croste

di Fontina ed all'estrazione del DNA con il kit Epicentre, che permette l'estrazione di un DNA di alta qualità e conseguentemente una minimizzazione dei problemi apportati dalla massiccia presenza di inibenti nella Fontina. La grande potenzialità del metodo si esplica nell'individuazione precoce di eventuali contaminazioni delle croste, evitando l'immissione sul mercato delle forme. Nel caso delle muffe, lo sviluppo del metodo rapido acquisisce maggiore importanza rispetto alle tecniche rapide di ricerca di batteri e lieviti, in quanto le tecniche tradizionali per l'identificazione di questi ultimi, necessitano di alcuni giorni per l'ottenimento del risultato, ma per le muffe normalmente sono necessari almeno 5 giorni. Per *C. herbarum*, in particolare, tradizionalmente sarebbero necessari ben 15 giorni di incubazione. È da ricordare, che in tutti i campioni risultati positivi, non è stata osservabile alcuna crescita su piastra, per cui la rilevazione tradizionale della muffa, oltre che lunga, risulta inaffidabile quantitativamente e qualitativamente.

Costruita la metodica (dotata di una sensibilità di 10^2 ufc/g), dall'analisi di PCR quantitativa condotta sui campioni di Fontina pervenuti in Ottobre 2008 risulta che la carica media presente sulle croste è dell'ordine di grandezza di 10^2 - 10^3 spore/g con picchi che raggiungono le 10^5 spore/g. La contaminazione apparente non è risultata rispecchiare sempre la carica effettiva, in quanto talvolta a parità di carica, alcuni campioni mostrano un decadimento qualitativo importante (iscuremento e granulosità della crosta), mentre altri appaiono inalterati. Le croste di Fontina apparentemente non contaminate, se non sottoposte ad analisi, rischiano di entrare in commercio con una grande possibilità di decadimento del prodotto a breve termine. La metodica di PCR quantitativa costruita può coadiuvare in modo determinante la valutazione delle forme di Fontina prima dell'immissione sul mercato.