

**Università degli Studi di Milano**

**Facoltà di Agraria**

**DISTAM**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e  
Microbiologiche

Dottorato di ricerca in

**Biotechnologie degli Alimenti** Ciclo: XX

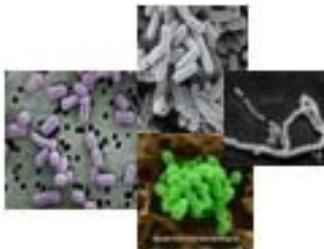
**INDIVIDUAZIONE E TIPIZZAZIONE  
POLIFASICA DI ECOTIPI FUNZIONALI DI  
BATTERI LATTICI COINVOLTI NELLE  
PRODUZIONI CASEARIE ITALIANE**

TUTOR: Prof. MARIA GRAZIA **FORTINA**

COORDINATORE: LUCIANO **PIERGIOVANNI**

FRANCESCA CLAUDIA **BORGIO**

Matricola R05914



Anno Accademico  
2004-2007

**1.**

**I batteri lattici  
e il settore lattiero  
caseario**

## 1.1 Caratteristiche generali

I batteri lattici sono un gruppo di procarioti in grado di fermentare diversi substrati, dando origine a numerosi prodotti di interesse per il settore agroalimentare e industriale.

Questo gruppo di microrganismi possiede le seguenti caratteristiche generali: cellule Gram-positive di forma bastoncellare o coccoide disposte in catene di due o più elementi, immobili, non sporigeni e generalmente non patogeni. Questi batteri danno luogo a colonie piuttosto piccole e incolori nei terreni di coltura e dal punto di vista nutrizionale risultano esigenti e, date le loro limitate capacità biosintetiche, necessitano di molte vitamine, amminoacidi e basi azotate. Sono incapaci di ridurre i nitrati a nitriti se non in particolare condizioni e sono catalasi negativi.

Sono batteri anaerobi ossigeno tolleranti, sono infatti privi di citocromi e ottengono l'energia necessaria attraverso la fosforilazione del substrato piuttosto che dal trasporto degli elettroni e dalla fosforilazione ossidativa. Possiedono quindi un metabolismo energetico di tipo fermentativo e sono in grado di produrre acido lattico a partire da uno o più carboidrati attraverso la via omolattica o eterolattica e per questo motivo vengono divisi nei seguenti sottogruppi, come riportato nel *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Kandler & Weiss, 1986; Schleifer, 1986):

- omofermentanti obbligati: trasformano il glucosio quasi interamente in acido lattico tramite la via glicolitica (o di Embden-Meyerhof);
- eterofermentanti facoltativi: omofermentanti che possiedono una fosfochetolasi inducibile in presenza di pentosi, che vengono quindi fermentati ad acido lattico ed acido acetico. Gli esosi vengono utilizzati secondo la via omolattica;
- eterofermentanti obbligati: non possedendo un enzima chiave della via glicolitica (fruttosio 1,6-difosfato), fermentano il glucosio secondo la via dei pentosofosfato (6-fosfogluconato) con produzione in rapporto equimolare di acido lattico, CO<sub>2</sub> ed etanolo o acido acetico.

Le temperature ottimali per la loro crescita variano dai 15-20°C ai 40-45°C: alcune specie crescono anche a temperature di 4°C, altre fino a 50-55°C. Alcuni di essi sono resistenti a trattamenti di pastorizzazione. Sono presenti in natura in svariati ambienti: dai vegetali al tratto digerente di alcuni mammiferi e, per questo motivo, si ritrovano comunemente nel latte e nei suoi derivati. La loro presenza nel terreno e nelle acque è dovuta a precedenti contaminazioni da animali o piante.

I batteri lattici rivestono un ruolo rilevante in svariati processi industriali per la loro capacità di produrre diverse sostanze utili; in particolare per quanto riguarda il settore agroalimentare questi microrganismi sono fondamentali per la produzione di alimenti fermentati (Buckenhüskes, 1993). Tra i vari alimenti per la cui produzione sono coinvolti i batteri lattici troviamo formaggi, latti fermentati, insaccati,

foraggi insilati, vegetali fermentati ed inoltre i prodotti da forno ottenuti con l'impiego di "lievito naturale" o "madre acida" (Foschino *et al.*, 1995; Ottogalli, 2001; Galli Volonterio, 2002).

## 1.2 Le implicazioni nel settore lattiero-caseario

I batteri lattici sono i più importanti microrganismi al fine della trasformazione del latte e maturazione del formaggio e intervengono in quasi tutti i processi di caseificazione (De Roissart & Luquet, 1994; Desmazeaud & Cogan, 1996; Ottogalli, 2001). A tutte le preparazioni ottenute grazie al loro intervento i batteri lattici conferiscono caratteristiche aromatiche e organolettiche particolari mediante la produzione di acido lattico, acetaldeide, diacetile ed altre sostanze; sono inoltre in grado di inibire la crescita di microrganismi indesiderati, in particolare patogeni, tramite la produzione di sostanze ad attività antimicrobica. All'interno di questo gruppo di batteri si distinguono infatti diverse specie dotate di spiccata attività acidificante da altre in grado di produrre sostanze aromatiche che conferiscono al prodotto caratteristiche sensoriali tipiche (Gipron *et al.*, 1991).

Il processo di acidificazione è rilevante sia dal punto di vista tecnologico ed economico nella produzione dell'alimento finito, sia sotto l'aspetto della sicurezza alimentare. Non va trascurata l'importanza dell'utilizzo di batteri alto-acidificanti, i quali possono svolgere un efficace ruolo di controllo della popolazione microbica proliferante nella matrice alimentare, prevenendo l'instaurarsi di microrganismi patogeni quali *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.* o *Clostridium spp.* Di questi ultimi è infatti provata la scarsa attitudine a proliferare in ambienti acidi. Va quindi tenuto in alta considerazione l'aspetto della sicurezza, dato che in questo modo può essere attuato un controllo integrato e del tutto *food-grade*. Dal punto di vista più marcatamente economico e

tecnologico, l'importanza di utilizzare colture alto-acidificanti, permette di realizzare le condizioni di produzione in tempi minori, risultandone un notevole risparmio energetico e monetario, soprattutto se valutato su larga scala di produzione. Dal punto di vista tecnologico infatti l'abbassamento di pH a valori minori di quelli naturali (circa 6,8) provoca una destabilizzazione della carica superficiale delle micelle caseiniche, provocando coagulazione anche quando la lisi enzimatica della caseina non ha raggiunto i livelli ottimali: l'acidità agisce quindi in sinergia con gli enzimi del caglio, poiché un abbassamento del pH prossimo al valore di 5,5 crea un ambiente ottimale per l'azione di questi enzimi.

In seconda istanza il ruolo dei batteri lattici impiegati nell'industria lattiero-casearia si esplica durante il processo di maturazione dei formaggi come riportato da Limsowhin *et al.* (1996). In questa fase infatti si assiste ad una netta variazione della composizione della matrice alimentare: in particolare si registra, oltre ad una sensibile variazione del pH, uno spiccato aumento della concentrazione salina. Questi due fattori restringono il campo dei possibili microrganismi che possono colonizzare la matrice e permettono l'instaurarsi di condizioni adeguate allo sviluppo di una popolazione prevalentemente lattica. In questa fase del processo tecnologico dunque, sono i batteri lattici a prendere il sopravvento sulle altre popolazioni microbiche, svolgendo diverse importanti azioni: lipolisi e proteolisi, catalizzate da enzimi esocellulari, determinano la formazione del "bouquet" di aromi tipici, mentre l'utilizzo di metabolismi anaerobi secondari, dà luogo alla formazione, nel prodotto, di CO<sub>2</sub> e composti

particolari che donano caratteristiche proprietà reologiche ed aromatiche al prodotto finito.

Secondariamente si registra un aumento dell'autolisi cellulare, che porta alla liberazione di quegli enzimi endocellulari quali proteasi, peptidasi e amminotransferasi che vanno a formare una lunga serie di composti aromatici che conferiscono la tipicità al prodotto. I principali componenti dell'aroma dei formaggi sono aldeidi, acidi, alcoli, esteri e composti solforati che derivano da processi degradativi a carico di amminoacidi. Vengono liberati nella matrice anche lipasi che determinano l'idrolisi dei trigliceridi ed il conseguente rilascio di acidi grassi a corta catena, anch'essi responsabili delle caratteristiche sensoriali del prodotto finito (Kinsella & Hwang, 1976; Fox, 1989; Hannon *et al.*, 2002).

Le colture impiegate nell'industria lattiero-casearia possono essere di diverse tipologie (Limsowhin *et al.*, 1996):

- Colture starter: si definisce starter o innesto una preparazione contenente microrganismi vivi di cui si sfrutta l'attività metabolica. Questa coltura microbica viene aggiunta alla materia prima per avviare e

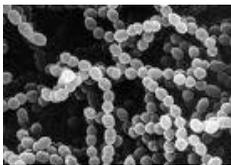
regolare il processo fermentativo, in modo che il prodotto finito abbia determinate caratteristiche (Buckenhüskes, 1993). Le colture starter sono ottenute mediante selezione in laboratorio in base a specifiche capacità e caratteristiche biotecnologiche dei ceppi che ne fanno parte, al fine di ottenere un prodotto finito con caratteristiche sensoriali standardizzate. Le principali specie che compongono tali colture sono: *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*, *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc* spp. (Fig. 1);



*Lactobacillus bulgaricus*



*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



*Streptococcus thermophilus*



*Lactobacillus helveticus*

**Figura 1.** Immagini al microscopio elettronico di alcune specie di batteri lattici utilizzati nel settore lattiero-caseario.

- Colture di integrazione: sono colture che, abbinate a quelle starter, rivestono un ruolo importante durante la fase di maturazione, con la liberazione del pool enzimatico endocellulare;
- Colture naturali: colture microbiche preparate direttamente sul luogo di produzione, a partire dal latte (lattoinnesto) o dal siero (sieroinnesto). Per preparare il lattoinnesto un'aliquota di latte viene riscaldata a 60-65°C per 15-20 minuti, rapidamente raffreddata e successivamente incubata. Il siero innesto viene ottenuto invece tramite incubazione di un'aliquota del siero residuo derivante dalla precedente caseificazione; in quest'ultimo caso è importante notare che la selezione avviene a valle del processo produttivo, ed è quindi influenzata dai parametri tecnologici impiegati;
- Colture non starter: nei formaggi prodotti artigianalmente, accanto alla popolazione microbica primaria costituita dalla coltura d'avvio, è presente una popolazione microbica secondaria. I batteri lattici non starter possono derivare dalla materia prima, dall'ambiente di lavorazione, dalle attrezzature, dagli ingredienti (caglio, sale) e anche dalle colture starter naturali impiegate. Tale popolazione microbica è estremamente diversificata e complessa, in quanto è costituita da una grande varietà di generi, specie e ceppi che vengono selezionati dalle particolari condizioni chimico-fisiche, dalla composizione del

formaggio, nonché dalla tecnologia applicata e dalle condizioni ambientali dell'edificio (Dellaglio *et al.*, 1998). I principali gruppi di microrganismi non starter sono lattobacilli mesofili, enterococchi, pediococchi, lieviti e batteri propionici (Desmazeaud & Cogan, 1996). Sebbene i NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) vengano indicati come popolazione microbica secondaria, essi rivestono un ruolo fondamentale nella produzione e maturazione di molte tipologie di formaggi.

### **1.3 La tipicità dei prodotti caseari**

Accanto alle produzioni industriali che impiegano colture starter selezionate, consentendo una maggiore standardizzazione del prodotto ed un riduzione degli scarti di lavorazione, non bisogna dimenticare l'elevato numero di produzioni artigianali locali basate sull'impiego di popolazioni microbiche naturali selezionate nel corso del tempo. Sono queste popolazioni naturali a conferire tipicità e unicità ad una vasta gamma di produzioni alimentari che molte aziende artigianali propongono sul mercato. In particolare gli alimenti tipici sono uno dei principali elementi caratterizzanti il mercato italiano e ciò pone una serie di problemi, non solo relativi alla scelta delle strategie generali del settore e alle specifiche di prodotto, ma anche alla garanzia di qualità e della tipicità del prodotto stesso. A questo proposito un primo aspetto chiave su cui è necessario soffermarsi è il forte legame che questi alimenti hanno col processo produttivo e soprattutto col territorio.

L'importanza di questo aspetto ha portato all'istituzione, da parte della Comunità Europea, di tre livelli di tutela dei prodotti tipici a riconoscimento delle culture e tradizioni locali, questi marchi sono: DOP (Denominazione di Origine Protetta), IGP (Indicazione Geografica Protetta) e STG (Specialità Tradizionale Garantita). L'utilizzo di questi marchi sui prodotti alimentari serve da un lato ad offrire al consumatore un prodotto con precise caratteristiche qualitative e di produzione, dall'altro a tutelare il produttore da concorrenza sleale.

Nella valutazione della tipicità di un prodotto rientrano vari parametri come la sua concentrazione in un territorio geografico definito, le

caratteristiche del processo produttivo tradizionale, la sua identificabilità da parte del consumatore e la sua rispondenza ai tradizionali attributi che lo caratterizzano (contenuto di materie prime e altri attributi organolettici). Ultimamente si sta rivolgendo particolare attenzione anche all'identificazione dei microrganismi presenti in questi prodotti e al loro ruolo come uno dei principali anelli di congiunzione tra il territorio di produzione e le caratteristiche del prodotto. A tal proposito risulta quindi necessario valutare quanto l'attività della popolazione microbica naturalmente presente nella materia prima, negli innesti impiegati nel processo di trasformazione e quella derivante dall'ambiente di produzione, rappresenti uno degli elementi fondamentali ai fini della denominazione di origine e di conseguenza della tipicità del prodotto (Fortina & Manachini, 2001).

Queste considerazioni hanno trovato un ambiente fertile nella realtà italiana che è notoriamente caratterizzata da un elevato numero di prodotti tipici, in particolare di formaggi, strettamente legati alla complessa componente microbica naturale che interviene durante tutte le fasi della loro trasformazione. Il settore lattiero-caseario ad esempio, è caratterizzato da una vasta gamma di prodotti come burro e formaggio, yogurt e altri tipi di latte fermentato, il cui denominatore comune è l'utilizzo di batteri lattici, i quali attraverso differenti processi produttivi permettono la trasformazione della materia prima latte in prodotto finito.

L'importanza dei batteri lattici per le trasformazioni alimentari ha portato ad una selezione degli stessi in funzione delle caratteristiche metaboliche di ogni specie, al fine di ottenere un prodotto finito di qualità

ottimale. Sono stati così selezionati diversi tipi di colture starter da aggiungere alla materia prima o ad un semilavorato, in una determinata fase del processo, per far partire e/o controllare un'attività microbica necessaria alla preparazione o maturazione del prodotto alimentare. Queste colture vengono comunemente selezionate in base alle caratteristiche tecnologiche possedute, come l'attitudine alla crescita in latte (utilizzo del lattosio: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*; l'utilizzo del galattosio: *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc* spp.), la velocità di acidificazione, l'attività proteolitica (*Lactobacillus* spp. ed *Enterococcus* spp.), l'attività aromatica, la produzione di polisaccaridi extracellulari (*Lactobacillus bulgaricus*) e la resistenza ai batteriofagi. Tali caratteristiche assumono diversa importanza in funzione del tipo di prodotto che si vuole ottenere: per la produzione di yogurt, ad esempio, sarà importante la velocità di acidificazione e la produzione di polisaccaridi extracellulari per conferire cremosità al prodotto finito; nel caso del burro invece si sceglieranno colture con buona attività aromatica (produzione di diacetile); per quanto riguarda il formaggio sarà importante la velocità di acidificazione durante la fase di coagulazione per favorire la precipitazione delle micelle di caseina, mentre, durante la fase di maturazione, sarà preponderante l'attività proteolitica e lipolitica per conferire l'aroma finale al prodotto.

Per questo motivo già da diversi anni numerosi studiosi auspicano un ritorno più massiccio allo studio della componente microbica naturale di un dato alimento e quindi alla selezione dei ceppi più rappresentativi presenti

negli ambienti naturali di preparazione e lavorazione ed i loro impieghi come colture starter naturali. Queste colture naturali dovrebbero sostituire quelle, abbastanza anonime, offerte dal commercio, proprio per salvaguardare l'artigianalità tipica dei prodotti locali. I ceppi autoctoni possono infatti presentare peculiari caratteristiche e proprietà più competitive di quelli selezionati in laboratorio, in quanto negli ambienti di lavorazione è già avvenuta una selezione mirata per quelle capacità che possono comparire solo casualmente nei ceppi isolabili da altri ambienti (Fortina *et al.*, 1998; Baruzzi *et al.*, 2000; Coppola *et al.*, 2001).

Lo studio della biodiversità è quindi rivolto all'individuazione della popolazione microbica specifica responsabile della tipicità, ma anche della sua preservazione attraverso l'allestimento di ceppoteche. Queste hanno la funzione di mantenere nel tempo i principali biotipi responsabili della tipicità di un prodotto garantendo che un'eventuale variazione dei parametri di produzione non comportino la perdita di quelle peculiari caratteristiche che il consumatore è disposto a riconoscere anche in termini economici.

La possibilità di identificare, riconoscere, differenziare ceppi microbici anche strettamente correlati costituisce quindi un aspetto fondamentale non solo per scopi tassonomici e per la caratterizzazione di nuovi isolati, ma anche per seguire meglio l'evoluzione di una data popolazione microbica che concorre all'ottenimento del prodotto finito e, in seconda istanza, per rendere possibile il trasferimento di una produzione dal livello artigianale a quello industriale.

In questo ambito si inserisce il progetto di ricerca seguito nei laboratori di Microbiologia Industriale del DISTAM (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano), che si prefigge di selezionare e conservare la popolazione microbica caratteristica di prodotti lattiero-caseari tipici come la Toma e la Robiola piemontese, il Grana padano, il Provolone, il Bra tenero e duro.

### *1.3.1 Il formaggio*

Per la legge italiana “il nome di formaggio o cacio è riservato al prodotto che si ricava dal latte intero o parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale da cucina” (RDL n. 2033 del 15/10/1925). Questa definizione appare molto sintetica ed incompleta, per questo motivo di seguito viene riportata la definizione elaborata da una commissione in sede Codex Alimentarius: “Il formaggio è il prodotto stagionato o non stagionato di consistenza molle o semidura, dura o extra dura che può essere incartato e nel quale il rapporto proteine del siero/caseina non supera quello dl latte, e che è ottenuto:

- a) per coagulazione completa o parziale delle seguenti materie prime: latte e/o prodotti provenienti dal latte, grazie all'azione del caglio o di altri agenti coagulanti appropriati e per dissierazione parziale del lattosiero risultante da questa coagulazione;
- b) per l'impiego di tecniche di fabbricazione comportanti la coagulazione del latte e/o di prodotti provenienti dal latte in modo da ottenere un prodotto finito avente le caratteristiche simili a quelle del prodotto finito come descritto in a).

Il formaggio stagionato è un formaggio che non è pronto a essere consumato poco dopo la sua fabbricazione ma che deve essere mantenuto per un certo tempo alle temperature e nelle condizioni necessarie affinché avvengano i cambiamenti biochimici e fisici caratteristici del formaggio. Il formaggio affinato alle muffe è un prodotto stagionato in cui la maturazione è ottenuta essenzialmente dalla proliferazione delle muffe caratteristiche, nella massa e/o sulla superficie del formaggio. Il formaggio non stagionato è pronto al consumo poco tempo dopo la sua fabbricazione”.

I criteri di classificazione dei formaggi sono diversi, in funzione delle varie caratteristiche che si possono prendere in considerazione, da quelle compositive a quelle microbiologiche, biochimiche, tecnologiche e chimico-strutturali. In tabella 1 sono riportati i possibili criteri di classificazione tra questi: la distinzione in base al contenuto in grasso; questo parametro può rappresentare anche un indice di interesse nutrizionale, se valutato insieme al contenuto in acqua del formaggio. Un altro criterio di

classificazione è quello basato sulla struttura e consistenza della pasta, in base al quale si riconoscono formaggi molli (spurgo limitato, assenza di cottura, contenuto in acqua superiore al 45%), semi-duri (spurgo con riscaldamento in caldaia a temperature intorno a 45°C) e duri (spurgo spinto con riscaldamento in caldaia a temperature superiori ai 54°C, contenuto in acqua minore del 40%). Si distinguono poi i formaggi, a pasta erborinata, caratterizzata da una struttura morbida bianca, con venature verdi-blu dovute allo sviluppo fungino e quelli ottenuti con particolari operazioni tecnologiche, quali filatura, pressatura e cottura. I formaggi possono essere distinti anche in funzione del tempo di maturazione, in formaggi freschi, a media e lunga stagionatura.

Interessante è anche la differenziazione sulla base della tipologia delle colture microbiche impiegate, che influenzano il processo di acidificazione e l'intero periodo di maturazione. Alle condizioni ambientali e tecnologiche e alle colture microbiche impiegate sono legate anche le attività proteolitiche e lipolitiche e la formazione di una crosta superficiale caratteristica dei vari formaggi a crosta fiorita (Fortina, 2007).

<b>Criteri di classificazione</b>	<b>Tipologia di formaggio</b>	<b>Esempi</b>
Contenuto lipidico (% grasso su peso secco)	Grassi (>42%) Semigrassi (36-42%) Leggeri (20-35%) Magri (<20%)	Crescenza Grana, Parmigiano Vari Vari
Struttura della pasta	Molle Semidura Dura	Caprino, Crescenza, Mozzarella Fontina, Montasio, Toma Grana,

## 1. I batteri lattici e il settore lattiero caseario

	Erborinata Filata Pressata Fusa	Parmigiano, Pecorino Gorgonzola, Roquefort Mozzarella, Provolone Caciocavallo Sottilette, formaggini vari
Struttura della crosta	Assente Tenera/sottile Dura/sottile Molto dura	Vari Taleggio, Camembert Fontina, Montasio, Toma Grana, Parmigiano
Durata della maturazione	Freschi Medi Stagionati	Caprino, Primosale, Mozzarella Fontina, Taleggio, Toma Grana, Parmigiano
Colture d'avvio	Siero-innesto Latto-innesto Colture starter LAB LAB + muffe LAB + batteri propionici	Parmigiano, Grana, Provolone Asiago, Montasio Crescenza, Taleggio Gorgonzola, Camembert Emmental
Tipo di latte	Vacca Pecora Capra Bufala	Vari Pecorino Caprino, Tomini Mozzarella

**Tabella 1. Criteri di classificazione per le diverse tipologie di formaggio**

### 1.3.2 Il latte-fermentato

La fermentazione del latte, tramite la trasformazione del lattosio per intervento di popolazioni microbiche spontanee, ha rappresentato uno dei primi processi fermentativi conosciuti dall'uomo. I lattici fermentati sono

prodotti per coagulazione del latte senza sottrazione del siero, ad opera di colture d'avvio caratteristiche per ciascun tipo di latte fermentato; tali colture, per legge, devono mantenersi vive e vitali fino al momento del consumo (Ottogalli, 1991).

Il latte fermentato prodotto oggi nel mondo ha diverse caratteristiche, in quanto frutto delle particolari condizioni ambientali, dei microrganismi utilizzati nel processo fermentativo e della tecnologia produttiva. Secondo la definizione FIL-IDF del 1964 "*I lattii fermentati sono prodotti derivati dal latte che hanno proprietà speciali, legate all'esistenza di una microflora specifica ed attiva e con la presenza di sostanze risultanti dal metabolismo di questi microrganismi*" (Battistotti & Bottazzi, 1998; Bottazzi, 2004).

In funzione delle specifiche colture starter impiegate, i lattii fermentati vengono classificati in tre tipologie: lattii acidi termofili, lattii acidi mesofili e lattii acido-alcologici.

I *lattii acidi termofili* comprendono quei lattii fermentati che vengono ottenuti con l'impiego di colture termofile omofermentanti, utilizzate sia singolarmente che in associazione con ceppi mesofili. Rientrano in questa tipologia di prodotto il più noto di questa categoria, lo yogurt, ed i lattii di recente formulazione ottenuti utilizzando anche ceppi "probiotici".

I principali microrganismi componenti le preparazioni probiotiche oggi in commercio sono ascrivibili a specie di due soli generi, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Shah, 2007). In particolare sono:

- lattobacilli, quali: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum*;

- bifidobatteri, quali: *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*
- streptococchi, quali: *S. thermophilus*;
- lattococchi, quali: *L. lactis*, *L. cremoris*;

La letteratura scientifica propone un sempre maggior numero di microrganismi considerati probiotici, anche se per questi nuovi ceppi molto raramente è disponibile una caratterizzazione approfondita, compiuta in accordo a quanto richiesto da Organismi Internazionali, quali FAO e WHO. In specifico, per poter essere considerati probiotici, i ceppi devono soddisfare differenti requisiti, i quali sostanzialmente sono finalizzati all'osservanza di due principali necessità:

- essere sicuri per l'impiego nell'uomo, in particolare per quanto riguarda antibiotico-resistenze acquisite e/o trasmissibili;

- raggiungere vitali l'intestino ed essere in quella sede metabolicamente attivi ed in quantità tale da giustificare gli effetti benefici sulla salute dell'uomo che devono essere verificati in studi di efficacia.

La preparazione di latte fermentato arricchiti con microrganismi probiotici è sempre più viva e dinamica e diventa, a questo scopo, fondamentale l'impiego di microrganismi con proprietà definite, vale a dire opportunamente selezionati. Ovviamente i microrganismi che rientrano in queste preparazioni devono risultare idonee per poter essere destinati all'alimentazione umana, rispondendo ai requisiti stilati come fondamentali nelle linee guida per la valutazione dei probiotici negli alimenti (FAO/WHO, 2002, [www.who.int](http://www.who.int)).

I latti acidi mesofili sono ottenuti per fermentazioni condotte a temperatura ambiente e spesso sono caratteristici dei vari paesi di provenienza (sour milk nei paesi anglosassoni; lait acidifié in quelli francofoni). Tra questi prodotti si annoverano i latti acidi, le creme acide e il latticello.

I latti acido-alcologici sono caratterizzati dalla associazione tra batteri lattici e lieviti; contengono quindi, come prodotti della fermentazione, non solo acido lattico, ma anche alcool e CO<sub>2</sub>. Il più noto latte acido-alcologico è il kefir, bevanda tipica delle regioni asiatiche e medio-orientali.

## **Bibliografia**

**Baruzzi F., Morea M., Matarante A. and Cocconcelli P.S.** (2000). Changes in the *Lactobacillus* community during Ricotta forte cheese natural fermentation. *J Appl Microbiol*, **89**: 807-814.

**Battistotti B. and Bottazzi V.** (1998). Microbiologia e tecnologia dei lattici fermentati. In: *I lattici fermentati. Aspetti biochimici, tecnologici, probiotici e nutrizionali*. Ed. Istituto Danone, Milano, **3**: 25-72.

**Bottazzi V.** (2004). *Lattici fermentati funzionali probiotici. Nuove opportunità per il benessere dell'uomo*. Ed. Elite communication.

**Buckenhüskes H.J.** (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starters cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol Rev*, **12**: 253-272.

**Coppola S., Blaiotta G., Ercolini D. and Moschetti G.** (2001). Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J Appl Microbiol*, **90**: 414-420.

**De Roissart H. and Luquet F.M.** (eds) (1994). *Bacteries lactiques*, 1 Loriga, Uriage, France.

**Dellaglio F., Lombardi A. and Torriani S.** (1998). Tassonomia e nuove prospettive nella identificazione dei microrganismi non starter di interesse caseario. *Ind Latte*, **XXXIV**: 57-76.

**Demazeaud M. and Cogan T.M.** (1996). Role of cultures in cheese ripening. In: Dairy Starter Cultures. Ed. Cogan T.M. & Accolas J.P, VHC Publihers, New York, **8**: 207-232.

**Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.** (2002). Report of a Join FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 30 April-1 May 2002.

**Fortina M.G., Nicastro G., Carminati D., Neviani E. and Manachini P.L.** (1998). *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. J Appl Microbiol, **84**: 72-80.

**Fortina M.G. and Manachini P.L.** (2001) Qualità e tipicità degli alimenti: biodiversità e ruoli dei microrganismi. Atti del convegno “Le cucine della memoria”. Forum Udine, 19-39.

**Fortina M.G.** (2007). I prodotti caseari. In: “ La microbiologia applicata alle industrie casearie” a cura di Cocolin L.S. e Comi G. Ed Aracne, **4**: 289- 336.

**Foschino R., Galli A., Perrone F. and Ottogalli G.** (1995). Prodotti da forno ottenuti da impasti a lievitazione naturale: studio e caratterizzazione della microflora tipica. Tecnica Molitoria, 485-510.

**Fox P.F.** (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. J Dairy Sci, **72**: 1379-1400.

**Galli Volonterio A.** (2002). Microbiologia degli alimenti. Epitesto.

**Gipron J.C, Monnet V., Lambert G. and Desmazeaud M.J.** (1991). Microbial enzymes in cheese ripening. In: Food enzymology. Ed. Fox P.F Elsevier science Publish. Ltd, London, 131.

**Hannon J.C., Wilkinson M.G, Delahunty C.M., Wallace J.M, Morrissey P.A. and Beresford T.P.** (2002). Use of autolytic starter system to accelerate the ripening of Cheddar cheese. *Int Dairy J*, **13**: 313-323.

**Kandler O. and Weiss N.** (1986). Regular, nonsporing gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, **2**: 1208-1234.

**Kinsella J.E. and Hwang D.H.** (1976). Enzymes of *Penicillium roquefortii* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *Critical Rev food Sci Nutrit*, **8**: 191-228.

**Limsowhin G.K.Y., Powell I.B. and Parente E.** (1996). Types of starters. In: *Dairy Starter Cultures*. Ed. Cogan T.M. & Accolas J.P, VHC Publihers, New York, **4**: 101-129.

**Ottogalli G.** (1991). *Microbiologia lattiero-casearia*. Clesav-Città Studi, Milano, Italia

**Ottogalli G.** (2001). *Atlante dei formaggi: guida a oltre 600 formaggi e latticini provenienti da tutto il mondo*. U.Hoepli.

**Schleifer K.H.** (1986). Gram-positive cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, **2**: 999-1002.

**Shah N.P.** (2007). Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J*, **17**: 1262-1277.

**2.**

**Valorizzazione e  
caratterizzazione della  
popolazione microbica  
autoctona delle produzioni  
casearie italiane**

## **2.1 La biodiversità nei microrganismi di interesse alimentare**

Negli ultimi anni il dibattito relativo alla valutazione dei parametri di tipicità ha assunto un'importanza sempre rilevante, in particolare per quanto riguarda il ruolo dei microrganismi, come uno dei principali anelli di congiunzione tra il territorio di produzione (ecosistema ambiente-popolazione microbica autoctona) e le caratteristiche del prodotto.

Da ciò si può dedurre che la qualità di un prodotto alimentare, nella sua globalità, non può prescindere dalla sua qualità microbiologica, marchio di genuinità e di garanzia dell'alimento stesso. Per conseguire un reale successo in questo settore, e poter quindi elaborare per i diversificati prodotti tipici tradizionali, una mirata carta di identità microbiologica, è necessario acquisire, per ogni alimento tipico, conoscenze più approfondite sulle popolazioni microbiche naturalmente presenti nella materia prima, negli innesti impiegati nel processo di trasformazione e quelli derivanti dall'ambiente di produzione.

La caratterizzazione e preservazione delle popolazioni microbiche di un prodotto può essere perseguita seguendo alcuni criteri fondamentali. Dapprima si deve ottenere una corretta identificazione degli isolati naturali, spesso soggetti ad ampia variabilità tassonomica rispetto ai ceppi di riferimento, attraverso uno studio polifasico e genetico di base. In secondo luogo si procede con un approccio biochimico e biotecnologico per valutare la presenza di particolari biotipi nell'ambito della stessa specie ed il loro ruolo attivo nel conferimento della tipicità del prodotto. Infine si continua con una tipizzazione molecolare che dovrebbe permettere di

ottenere importanti informazioni sui biotipi di interesse, come per esempio la presenza di un polimorfismo genetico, l'ottenimento di un fingerprinting specie e ceppo-specifico e non da ultimo la presenza ed il ruolo di DNA extracromosomale.

## **2.2 Biodiversità fenotipica e biotecnologica**

Un'indagine sufficientemente ampia della biodiversità fenotipica e biotecnologica consente di ricondurre gli isolati in esame, in primo luogo, allo loro collocazione tassonomica ed in secondo tempo ad una loro approfondita caratterizzazione a livello di biotipo.

Nell'ambito dei batteri lattici, si possono saggiare alcune caratteristiche colturali, fisiologiche e biotecnologiche, quali ad esempio il potere proteolitico, l'attività acidificante, la produzione di batteriocine, la resistenza al lisozima e all'attacco dei batteriofagi.

A questi studi devono essere abbinate ricerche mirate all'individuazione di fattori di virulenza e/o patogenicità eventualmente presenti che possono essere legati ad un determinato biotipo nell'alimento. Recenti studi infatti hanno dimostrato che la catena alimentare può essere fonte di colonizzazione e infezione dell'uomo ad opera di batteri resistenti agli antibiotici (Jordens *et al.*, 1994; Devriese *et al.*, 1996; Van der Auwera *et al.*, 1996).

Il percorso dell'identificazione microbica segue pari passo l'evoluzione della disciplina della microbiologia, quindi prevede l'analisi macro e micro

## 2. Valoriz. e caratteriz. della popolazione microbica autoctona delle produzioni casearie italiane

morfologica attraverso l'uso del microscopio, lo studio e la determinazione delle fonti di carbonio e azoto utilizzate e le conseguenti esigenze colturali.

A queste si aggiungono le analisi per lo studio delle caratteristiche fisiologiche (metabolismo primario e secondario), le analisi sierologiche e la determinazione di alcune caratteristiche chimico-strutturali. Se inizialmente la specie batterica era definita come l'insieme di individui che manifestavano caratteristiche fisiologiche comuni, oggi è unitamente riconosciuto che ciò non è sufficiente ed è necessario che essi posseggano anche una percentuale di similarità della sequenza polinucleotidica del DNA uguale o superiore al 70% e di conseguenza la stessa percentuale di guanina e citosina (%GC) e un valore di correlazione filogenetica superiore o pari al 97% (Fig. 1) .

Durante l'ultimo decennio si sono sviluppati metodi molecolari che mirano direttamente alla caratterizzazione del genotipo del microrganismo da analizzare e consentono di studiare, a vari livelli, le relazioni esistenti tra gruppi di microrganismi e di distinguere uno specifico biotipo.

2. Valoriz. e caratteriz. della popolazione microbica autoctona delle produzioni casearie italiane

**Figura 1. Correlazioni filogenetiche dei domini microbici.**



## 2.3 Biodiversità genotipica

Negli ultimi anni l'evolversi della biologia molecolare ha contribuito alla valutazione del polimorfismo genetico all'interno della specie, così da selezionare rapidamente i differenti biotipi di interesse.

Parallelamente gli studi di biotipizzazione molecolare hanno permesso di mettere a punto delle metodologie di indagine alternative alle analisi tradizionali per giungere alla corretta identificazione tassonomica degli isolati in tempi brevi e senza l'impiego di strumentazioni particolarmente elaborate.

### 2.3.1 Tecniche di fingerprinting genetico

Queste tecniche sono basate sulla reazione a catena della DNA polimerasi (PCR, Polymerase Chain Reaction) che consente di ottenere, nell'arco di poche ore, milioni di copie di un certo filamento di DNA compreso tra due porzioni di DNA a sequenza conosciuta, dette primers (Saiki *et al.*, 1988).

L'amplificazione avviene mediante successivi cicli di denaturazione, appaiamento ed estensione, durante i quali si assiste ad un aumento esponenziale del numero di copie della porzione di DNA considerata (Mullis & Faloona, 1987).

Sulla base di questa tecnica sono state sviluppate differenti metodiche di indagine genetica, raggruppabili in due categorie principali. Alla prima appartengono tutte le tecniche legate allo studio di particolari regioni geniche, come ad esempio la creazione di sonde specie-specifiche o la

valutazione del grado di omologia genetica e l'analisi comparativa, dopo corsa elettroforetica, dei prodotti di digestione ottenuti mediante specifiche endonucleasi di restrizione (ER) (Marmur & Doty, 1962; Gillis *et al.*, 1970; Huss *et al.*, 1983). Il secondo gruppo è costituito da tecniche più recenti e innovative come la biotipizzazione molecolare attraverso il Rytotyping (Grimont & Grimont, 1986), l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Vaneechoutte *et al.*, 1992), la RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting) (Welsh & Mc Clelland, 1990). Queste tecniche avanzate di indagine genetica possiedono un elevato potere di risoluzione permettendo una più precisa individuazione di biotipi anche all'interno di una stessa specie. Con queste tecniche di indagine approfondite è possibile anche intervenire, attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, sulla "creazione" di nuovi ceppi con caratteristiche biotecnologiche migliori. Di seguito sono riportati alcuni esempi di queste analisi molecolari:

- Analisi di sequenza del gene 16S rDNA: l'analisi della sequenza nucleotidica dei geni codificanti per l'RNA ribosomale consente di ottenere un'accurata identificazione dei microrganismi allo studio e la loro conseguente corretta collocazione tassonomica. L'identificazione si basa sull'amplificazione, mediante tecnica della PCR, del gene 16S rDNA direttamente dalla brodocoltura dopo idonea lisi cellulare utilizzando dei primers che sono stati disegnati su regioni universalmente conservate, localizzate alle estremità del gene. Il frammento del gene, di circa 1,5 kb, viene direttamente sequenziato e la sequenza nucleotidica ottenuta

viene analizzata confrontandola con quelle finora depositate nella banca dati del National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Questo archivio di sequenze consente di costruire alberi filogenetici in cui andare a posizionare una sequenza ignota in modo tale da giungere ad una sua identificazione. L'RNA ribosomale (rRNA) ed i suoi geni (rDNA), a causa degli obblighi strutturali e funzionali che svolgono, sono delle molecole che contengono regioni altamente conservate tra i diversi gruppi microbici, ma anche regioni estremamente variabili, a livello di genere e di specie. Ciò ha permesso di utilizzare queste molecole a fini tassonomici, per la definizione su base genetica del raggruppamento in genere e specie.

- Analisi della regione spaziatrice dell'operone ribosomale (RSA): i geni che codificano per l'rRNA sono organizzati in uno o più operoni distanziati fra loro da regioni iper-variabili, denominate "spacers" (Fig. 2), che sono caratteristiche di un particolare genere batterico o di una determinata specie. La regione spaziatrice fra i geni che codificano per gli RNA ribosomali 16S e 23S possiede un tasso di mutazione più elevato dei singoli geni sopra citati (Gurtler & Stanisich, 1996) e la sua lunghezza varia notevolmente a seconda della specie e perfino, sebbene in maniera più ridotta, fra le diverse copie dell'operone ribosomale presenti lungo il medesimo genoma batterico (Bercovier *et al.*, 1986).



**Figura 2. Operone ribosomiale di una cellula batterica.**

- ARDRA- Amplified Ribosomal Restriction Analysis: in questa tecnica la PCR viene applicata ad un'analisi di restrizione, infatti la metodica prevede prima l'amplificazione del gene 16S rDNA e il suo successivo trattamento con opportuni enzimi digestivi. Il risultato produce un profilo di restrizione che molto spesso è caratteristico di una specie. Non bisogna, però dimenticare che la capacità discriminante di questa tecnica dipende dal tipo e dal numero di enzimi utilizzati.
- RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA: questa metodologia offre la possibilità di amplificare sequenze anonime di DNA, utilizzando un solo primer come innesco per l'enzima Taq polimerasi. L'amplificazione è resa possibile dal fatto che la reazione avviene in condizioni di bassa stringenza, cioè ad una temperatura di appaiamento del primer molto bassa. In tal modo il primer può appaiarsi anche a sequenze di DNA non esattamente complementari alla propria e dare origine ad una serie di amplificazioni il cui numero e la cui lunghezza varia da ceppo a ceppo. Nonostante questo metodo sia semplice e veloce, spesso non è riproducibile, in quanto anche piccoli cambiamenti nelle condizioni di amplificazione possono alterare il profilo di tipizzazione ottenuto.

- Sonde specie-specifiche: le sonde a DNA sono elementi nucleotidici di DNA batterico costituiti da 20 fino a 2000 oligonucleotidi, che hanno la caratteristica di essere specifici per un particolare gruppo di microrganismi. In alcuni casi le sonde identificano specifici geni, come quelli che codificano tossine batteriche o l'rRNA. In altri casi tali segmenti nucleotidici non sembrano possedere una sequenza codificante precisa, anche se ibridano in modo specifico con una porzione di DNA cromosomale che è comune a tutti i ceppi appartenenti ad una stessa specie. In linea teorica ogni microrganismo possiede almeno una sequenza nucleotidica unica che lo contraddistingue da tutti gli altri e che quindi può essere impiegata come sonda. La selezione di una sonda appropriata viene effettuata tramite uno screening crociato tra le diverse banche dati genomiche, che raccolgono le informazioni sulle sequenze nucleotidiche conosciute delle diverse specie finora studiate. Dopo aver individuato una particolare sequenza codificante, che sia caratteristica del ceppo allo studio, è possibile sintetizzare corti frammenti nucleotidici complementari ad esse con i quali si possono mettere a punto esperimenti di amplificazione specie-specifica.

### 2.3.2 *Elementi mobili: i plasmidi*

Un altro aspetto molto importante, riguardante lo studio del genoma batterico, è rappresentato dalla verifica della presenza e della funzione di elementi di DNA extracromosomale (plasmidi). La localizzazione a livello

plasmidico di alcuni geni codificanti per i più importanti requisiti tecnologici rende infatti questi elementi di forte interesse applicativo. Finora si conosce poco o nulla sui plasmidi, nonostante siano presenti in numerose specie microbiche; in molti casi non si sa quali espressioni fenotipiche siano portate a livello plasmidiale, tali DNA extracromosomali vengono denominati criptici.

I plasmidi batterici sono molecole di DNA extracromosomale che si replicano autonomamente, come componenti stabili del genoma della cellula. Essi possono variare sia in dimensioni, da una a diverse centinaia di chilobasi (kb), che per numero di molecole per cellula, da una o poche copie fino a centinaia (De Solar *et al.*, 1998).

La molecola plasmidica, costituita da un doppio filamento di DNA, può essere presente come forma circolare covalentemente chiusa (CCC), come forma aperta circolare (OC) o come forma aperta lineare (OL). Le forme OC e OL sono rispettivamente la conseguenza della rottura enzimatica o meccanica, in un punto di un solo filamento o di entrambi i filamenti della corrispondente forma nativa (Fig.3).



**Figura 3. Fotografia al microscopio elettronico di plasmidi in forma CCC.**

## 2. Valoriz. e caratteriz. della popolazione microbica autoctona delle produzioni casearie italiane

In condizioni di crescita vigilate, il numero di copie per cellula rappresenta una caratteristica fissa controllata da un sistema codificato dal plasmide stesso che determina la velocità d'inizio della replicazione. Data la natura potenzialmente autocatalitica del meccanismo di autoreplicazione, i meccanismi di controllo operati dai plasmidi devono utilizzare come principale strategia regolatrice l'inibizione (Pritchard *et al.*, 1969).

Inoltre, come ogni altro sistema autoregolatore, i sistemi di controllo della replicazione plasmidica devono essere in grado di percepire e correggere le eventuali fluttuazioni casuali del numero di copie. In ogni caso, i plasmidi naturali sono quasi sempre ereditati con grande precisione e fedeltà, pertanto il meccanismo di partizione deve essere considerato l'elemento chiave nell'eredità biologica di queste molecole. Si sottolinea però che tale processo non dipende solamente dal funzionamento coordinato e preciso di un complesso insieme di elementi regolatori codificati a livello plasmidico, ma anche dall'efficiente sincronia con alcune funzioni codificate dall'ospite e non ancora ben caratterizzate.

Queste caratteristiche genetiche concernenti il mantenimento e in particolar modo il controllo della replicazione, sono funzioni costanti ed universalmente presenti nelle molecole plasmidiche e potrebbero quindi essere considerati tratti genetici peculiari su cui basare l'identificazione e la classificazione di questi elementi extracromosomali.

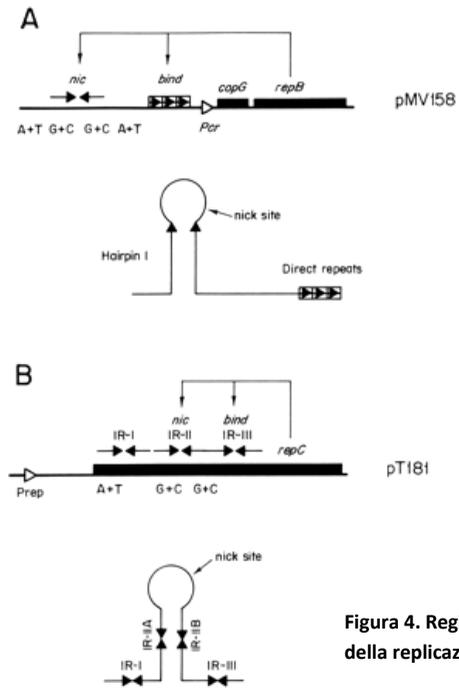
Una qualità peculiare che viene universalmente ereditata dai plasmidi e che rappresenta il tratto più appropriato per la classificazione è l'**incompatibilità**. Essa rappresenta l'incapacità di due plasmidi di

propagarsi in maniera stabile nella stessa linea cellulare evolutiva dell'ospite. L'incompatibilità è una manifestazione di correlazione tra due plasmidi che condividono elementi regolativi comuni, coinvolti nel controllo della replicazione e dell'equipartizione delle molecole plasmidiche tra le cellule figlie dell'ospite (Novick, 1987). L'incompatibilità plasmidica, quindi, è generalmente definita come l'insuccesso di due plasmidi coresidenti ad essere stabilmente ereditati, qualora non sussistano pressioni selettive esterne (Novick *et al.*, 1976).

La replicazione autonoma dei plasmidi avviene in maniera controllata, tali meccanismi di autoregolazione risiedono nei geni e nei siti richiesti per l'autonoma replicazione, i quali costituiscono l'unità replicativa di base dei plasmidi (**repliconi**). Generalmente i repliconi consistono di (Fig.4):

- una regione da cui ha inizio la replicazione della molecola, detta **origine di replicazione** (sito **ori**);
- una serie di geni e/o *loci* "**cop**", "**nic**", "**par**" coinvolti nel controllo dell'inizio della replicazione e della ripartizione;
- geni "**rep**" codificanti per proteine richieste per la replicazione e per il controllo della stessa.

2. Valoriz. e caratteriz. della popolazione microbica autoctona delle produzioni casearie italiane



**Figura 4. Regioni responsabili della replicazione dei plasmidi.**

I plasmidi codificano in primo luogo per proteine essenziali al loro mantenimento e replicazione all'interno della cellula ospite. Alcuni contengono geni che controllano le funzioni che sovrintendono ad una stabile e continua eredità dei plasmidi alle cellule figlie, come i geni preposti all'equipartizione durante la divisione cellulare, o quelli che assicurano il trasferimento mediante coniugazione. Oltre a questi geni utili ai plasmidi stessi, molti altri contengono informazioni genetiche utili al loro ospite. Esempi possono essere i geni codificanti per i fattori di virulenza, includendo tra questi la produzione di tossine, o quelli coinvolti nella

resistenza agli antibiotici e nella degradazione di composti organici di sintesi.

Il primo plasmide ad essere identificato è stato il plasmide F (chiamato anche fattore F) di *Escherichia coli*. Esso costituisce il prototipo dei cosiddetti plasmidi della fertilità nei batteri Gram-negativi. I ceppi di *Escherichia coli* con un plasmide F extracromosomale sono chiamati F+ e si comportano come donatori, mentre i ceppi privi del plasmidi F (detti F-) si comportano come recipienti. Le funzioni coniugative del plasmide F sono specificate da un insieme di almeno 25 geni di trasferimento (*tra*) che determinano l'espressione di pili F, la sintesi e il trasferimento di DNA durante la coniugazione. Ogni batterio F+ ha da 1 a 3 pili che si legano a specifiche proteine esterne di membrana sui batteri recipienti per iniziare la coniugazione. Un ponte intercellulare citoplasmatico è formato ed un filamento del DNA del plasmide F è trasferito dal donatore al recipiente, nel quale esso è convertito in DNA plasmidico circolare a doppio filamento nel batterio recipiente mentre un nuovo filamento è sintetizzato nel donatore per sostituire il filamento trasferito (Fig.5).

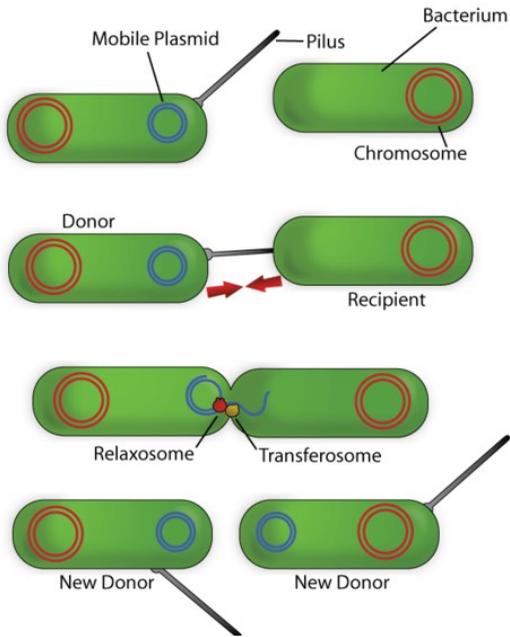
Nei batteri Gram-positivi è stato scoperto che il batterio donatore produce una particolare proteina (adesina) che permette l'aggregazione con le cellule recipienti e in questo caso non sono coinvolti pili sessuali. In alcuni generi (tra cui *Enterococcus* e *Streptococcus*) i batteri recipienti producono feromoni sessuali extracellulari i quali inducono i geni sul plasmide del ceppo donatore a produrre una sostanza di aggregazione (AS), che facilita il legame alle cellule recipienti attraverso un recettore complementare sulle proprie cellule. In questo modo è formato un canale

di coniugazione e il DNA plasmidico è trasferito dalla cellula donatrice alla cellula ricevente (Fig.6). I plasmidi dei feromoni sessuali possono portare uno o più geni correlati all'antibiotico-resistenza.

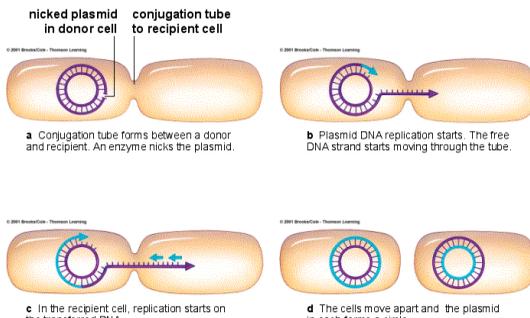
I plasmidi che conferiscono la resistenza agli antibiotici sono chiamati plasmidi **R** e sono trasferiti solitamente da cellula a cellula attraverso le membrane cellulari, processo nel quale è coinvolta la risposta ai feromoni sessuali (Grohmann *et al.*, 2003).

I plasmidi sono comuni nei batteri lattici, e differenze sono state trovate riguardo grandezza, funzione e distribuzione (Wang & Lee, 1997). Le funzioni da essi codificate riguardano l'idrolisi delle proteine, il metabolismo dei carboidrati, degli amminoacidi e del citrato, la produzione di batteriocine e di esopolissaccaridi, le resistenze agli antibiotici, ai metalli pesanti e ai batteriofagi.

2. Valoriz. e caratteriz. della popolazione microbica autoctona delle produzioni casearie italiane



**Figura 5. Meccanismo di trasferimento orizzontale genico mediante plasmide F.**



**Figura 6. Meccanismo di trasferimento orizzontale genico mediante plasmide che codifica per feromoni sessuali.**

### *2.3.3 Elementi mobili: i trasposoni e le sequenze di inserzione*

Un attento fingerprinting molecolare deve ricercare la presenza di ulteriori elementi mobili, quali i trasposoni ovvero segmenti di DNA che si possono trasferire da un sito ad altri bersaglio nella stessa molecola o in differenti molecole di DNA. Questo processo viene chiamato trasposizione ed è un evento importante sia nell'analisi genetica sia per il suo significato evolutivo. I trasposoni sono importanti elementi genetici perché possono causare mutazioni, riarrangiamenti a livello genomico, funzionano come regioni trasferibili di omologia genetica, acquisiscono nuovi geni e contribuiscono alla loro disseminazione entro la popolazione batterica. Non sono elementi genetici auto-replicanti e quindi essi devono integrarsi in un replicone per mantenersi stabilmente nel genoma batterico. Sono stati studiati nei batteri diversi tipi di trasposoni:

- Sequenze di inserzione **IS**
- Trasposoni complessi **Tn**
- Trasposoni coniugativi

Le sequenze di inserzione codificano solo per le informazione genetiche legate al loro spostamento. Sono strutture caratterizzate da due sequenze ripetute invertite IR e da un gene codificante per una nucleasi altamente specifica chiamata trasposasi. Una IS si può trasporre in qualunque sito del cromosoma. Durante tale processo, viene duplicata una breve sequenza del DNA bersaglio a livello del sito di integrazione e l'inserzione dell'elemento trasponibile inattiva i geni in cui si è integrato. Le

sequenze di inserzione conosciute variano in lunghezza approssimativamente da 780 a 1500 paia di nucleotidi (Mahillon & Chandler, 1998; Ricci & Fortina, 2006).

I trasposoni complessi variano in lunghezza da circa 2000 a più di 40000 paia di nucleotidi e contengono sequenze di inserzione alla loro fine. Il DNA tra le sequenze di inserzione terminali di un trasposone complesso codifica per diverse funzioni che non sono essenziali per la trasposizione. In batteri rilevanti dal punto di vista medico, sono geni che determinano la produzione di antigeni di aderenza, tossine e altri fattori di virulenza, o specifiche resistenze a uno o più antibiotici. Esempi ben noti di trasposoni complessi sono Tn5 e Tn10, che determinano la resistenza alla kanamicina e alla tetraciclina, rispettivamente (Requena *et al.*, 1995).

L'altra classe di trasposoni, scoperta nei batteri Gram-positivi e rappresentata da *Tn916*, consiste di trasposoni coniugativi che sono completamente differenti dai trasposoni sopra descritti. Il trasposone coniugativo non genera una duplicazione della sequenza bersaglio nella quale è inserito e nei batteri Gram-positivi il ceppo che porta il trasposone può agire come un donatore della coniugazione. Il trasposone è exciso dal cromosoma del donatore ed è trasmesso attraverso la coniugazione al recipiente, dove si integra in modo random nel cromosoma. *Tn916* codifica per la resistenza alla tetraciclina (Hummel *et al.*, 2007), ma altri trasposoni coniugativi di più alto peso molecolare possono codificare per altre resistenze agli antibiotici. I trasposoni coniugativi sembrano essere la maggior causa della diffusione dell'antibiotico-resistenza tra i batteri Gram-positivi.

2. Valoriz. e caratteriz. della popolazione microbica autoctona delle produzioni casearie italiane

## **Bibliografia**

- Bercovier H., Kafri O. and Sela S.** (1986). Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem Biophys Res Commun*, **136**: 1136-1141.
- De Solar G., Giraldo R., Ruiz-Echevarria M.J., Espinosa M. and Diaz-Oreias, R.** (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Micribiol Mol Biol Rev*, **62**: 434-464.
- Devriese L.A., Ieven M., Goossens I.I., Vandamme P., Pot B., Hommez J. and Haesebrouck F.** (1996). Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrobial agents Chemother*, **40**: 2258-2287.
- Gillis, M., Deley, J. and De Cleene, M.** (1970). The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *Eur J Biochem*, **12**: 143-153.
- Grimont F. and Grimont P.A.D.** (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur/Microbiology*, **137**: 165-175.
- Grohmann E., Muth G. and Espinosa M.** (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbial Mol Biol Rev*, **67**: 277-301.
- Gurtler V. and Stanisich V.A.** (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiol*, **142**: 3-16.
- Hummel A., Holzapfel W.H. and Franz C.M.A.P.** (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst Appl Microbiol*, **30**: 1-7.

**Huss, V.A.R., Festl, H. and Schleifer, K.H.** (1983). Studies on spectrophotometric determination of DNA hybridisation from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol*, **4** : 184-192.

**Jordens J.Z., Bates J. and Griffiths D.T.** (1994). Fecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrobial Chemother*, **34**: 515-528.

**Mahillon J. and Chandler M.** (1998). Insertion sequence. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 725-774.

**Marmur, J. and Doty, P.** (1962). Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol*, **5**: 109-118.

**Mullis K.B. and Faloona F.** (1987). Specific synthesis of DNA "in vitro" via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*, **155**: 335-350.

**Novick R.P.** (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev*: **51**, 381-395.

**Novick R.P., Clowes R.C., Cohen S.N., Curtis R., Datta N. and Falkow, S.** (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev*: **40**, 1689-189.

**Pritchard R.H., Barth P.T. and Collins J.** (1969). Control of DNA synthesis. *Symp Soc Gen Microbiol*, **19**: 263-297.

**Requena T., Yu W., Stoddard G.W. and McKay L.L.** (1995). Lactococcin A overexpression in a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* transformant containing a Tn5 insertion in the *lcnD* gene. *Appl Microbiol and Biotech*, **44**: 413-418.

**Ricci G. and Fortina M.G.** (2006). Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from cheeses by distribution studies of insertion sequences. Int J Food Microbiol, **112**: 112-119.

**Saiki R.K., Scharf S., Faloona G., Mullis K.B., Horn G.T., Herlich H.A. and Arnheim N.** (1988). The polymerase chain reaction. Science, **230**: 1350-1354.

**Van der Auwera P., Pensart N., Korten V., Murray B.E. and Leclercq R.** (1996). Incidence of oral glycopeptides on the fecal flora of human volunteers: selection of highly glycopeptides resistant enterococci. J Infect Dis, **173**: 1129-1139.

**Vanechoutte M., Rossau R., De Vos P., Gillis M., Janssens D., Paepe N., De Rouck A., Fiers T., Claeys G. and Kersters K.** (1992). Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiol Lett, **93**: 227-234.

**Wang T.T. and Lee B.H.** (1997). Plasmids in *Lactobacillus*. Crit Rev Biotech, **17**: 227-272.

**Welsh J. and Mc Clelland M.** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res, **18**: 7213-7218.

# **3. Obiettivi della ricerca**



Lo studio della variabilità fenotipica e genotipica dei microrganismi ha assunto negli ultimi anni notevole importanza, sia per gli aspetti scientifici di base che per i risvolti applicativi ad esso associabili. Da un punto di vista scientifico l'acquisizione di sempre più approfondite conoscenze della biodiversità microbica, ottenuta anche con l'ausilio di nuove e più mirate metodologie di indagine, ha consentito di evidenziare, nell'ambito di numerose specie microbiche, un elevato grado di polimorfismo sia genetico che fisiologico. In termini applicativi lo studio del polimorfismo microbico offre la grande opportunità di poter disporre di particolari biotipi che meglio si adattano a specifici processi del settore agro-alimentare, sfruttando appieno le peculiarità biotecnologiche dei microrganismi.

Nell'ambito di questo importante concetto di biodiversità, oggi giorno diversi settori agro-alimentari beneficiano degli studi effettuati sulla caratterizzazione della popolazione microbica autoctona responsabile della tipicità di un dato prodotto; tali studi hanno portato all'ottenimento di idonee colture selezionate il cui utilizzo consente di mantenere alti livelli di qualità del prodotto, salvaguardando nel contempo la tipicità dello stesso.

Anche il settore propriamente caseario nazionale, che si caratterizza per una vasta gamma di formaggi DOP, ha la necessità di affrontare uno studio più approfondito sulla popolazione batterica tipica delle sue produzioni, soprattutto nell'impiego di colture o innesti naturali che sono essenzialmente dei consorzi microbici, costituiti da specie e biotipi differenti, la cui complessità e ruolo non sono stati ancora completamente studiati.

In questo contesto, la ricerca in oggetto si è focalizzata sulla caratterizzazione di ceppi di batteri lattici in parte già disponibili ed in parte di nuovo isolamento da diverse matrici alimentari, lungo l'intera filiera produttiva.

La caratterizzazione dei ceppi in esame è stata perseguita attraverso diverse fasi operative: 1) studio fenotipico e genotipico di base per i ceppi di nuovo isolamento: l'integrazione di tali informazioni, o tassonomia polifasica, consente una più corretta identificazione degli isolati naturali, spesso soggetti ad ampia variabilità tassonomica rispetto ai relativi ceppi di riferimento 2) approfondimento biochimico e biotecnologico per valutare la presenza di particolari biotipi nell'ambito di una stessa specie, e il loro ruolo attivo nel conferimento della tipicità del prodotto 3) tipizzazione molecolare: l'evidenziazione di un eventuale polimorfismo genetico consente di creare un fingerprinting specifico per ciascun isolato o gruppi di isolati, mediante il quale è possibile seguire nel tempo l'evolversi di una data popolazione microbica e valutare in tempi brevi la purezza della coltura selezionata. Quest'ultimo aspetto è facilmente sondabile attraverso la messa a punto e l'impiego di alcune recenti metodologie di tipizzazione molecolari che si basano sulla reazione a catena della DNA polimerasi (PCR), quali la RSA (analisi della regione spaziatrice dell'operone ribosomale), l'ARDRA (analisi di restrizione dei geni del DNA ribosomale amplificato) e l'analisi di geni housekeeping. Questo approccio, definito "multilocus typing" consente di raggiungere l'elevato grado di discriminazione richiesto per capire a fondo il reale grado di diversità esistente nella specie analizzata 4) ricerca e studio di molecole di DNA

extracromosomale: attraverso una approfondita caratterizzazione strutturale e molecolare dei plasmidi presenti sarà possibile valutare meglio l'importanza ed il ruolo da essi svolto all'interno dei vari biotipi.

L' integrazione delle conoscenze fenotipiche, biotecnologiche e genotipiche ha consentito di ottenere un quadro complessivo della diversità dei ceppi saggiati in grado di fornire l' individuazione di biotipi caratteristici e discriminabili, in funzione anche della nicchia ecologica di provenienza.

In particolare sono stati presi in esame dei microrganismi facenti parte del gruppo dei batteri lattici (LAB- lactic acid bacteria) essendo questi di grande interesse applicativo nel settore lattiero caseario. All'interno di questo raggruppamento si trovano colture starter, e fra essi abbiamo preso in considerazione *Lactobacillus helveticus* impiegato come siero-innesto per la produzione di formaggi tipici italiani (Grana padano e Provolone), colture non starter, quali *Enterococcus italicus* una specie di nuovo isolamento della quale poco è noto circa l'attività biotecnologica e i fattori di virulenza ed infine *Lactococcus garvieae* per il quale si è inteso verificare la sicurezza d'uso nel settore lattiero caseario.

**4.**

**Differenti ecotipi  
di *Lactobacillus helveticus*  
in Grana Padano e Provolone**

#### 4.1 Il genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* (Kandler & Weiss, 1986; Hammes *et al.*, 1991) comprende specie Gram-positivo, a forma di bastoncino o cocco (singoli o a catene), anaerobio, microaerofilo o aerobio facoltativo, in gran parte immobili, asporigeno, che presentano metabolismo fermentativo con formazione di acido lattico da glucosio. Per quest'ultima caratteristica rappresenta uno dei più diffusi generi di batteri lattici nell'ambito lattiero-caseario. Le differenti specie ad esso ascrivibili e, all'interno delle singole specie, i vari biotipi rappresentati, possono venire impiegati con successo per l'allestimento di processi fermentativi, correlati alle peculiarità fisiologico-biotecnologiche che caratterizzano i vari ceppi. Per questo motivo, anche nell'ambito della microbiologia applicata, l'aspetto tassonomico riveste una fondamentale importanza. La caratterizzazione fenotipica e genotipica di base consente infatti una più corretta identificazione degli isolati; se poi a questi studi si associano degli approfondimenti biochimici e biotecnologici è possibile valutare la presenza di particolari biotipi nell'ambito di una stessa specie, ed il loro ruolo attivo nel conferimento della tipicità di un dato prodotto.

Per lungo tempo la tassonomia dei lattobacilli è stata basata esclusivamente sulle loro caratteristiche fenotipiche, venivano infatti divisi in tre sottogeneri: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium* (Orla-Jensen, 1919; Sharpe *et al.*, 1966; Reuter, 1986), in accordo con le loro temperature di crescita e la via metabolica seguita per la fermentazione degli esosi (omofermentanti o eterofermentanti). I moderni metodi molecolari mostrano come questa suddivisione sia in

disaccordo con le relazioni filogenetiche della specie (Schleifer, 1986). Il nuovo raggruppamento su basi molecolari è stato riesaminato da Hammes & Vogel (1995), che basano la loro suddivisione sul tipo di peptidoglicano che costituisce la parete cellulare e sulla via metabolica seguita per la fermentazione dei pentosi e degli esosi.

I moderni metodi di indagine tassonomica per i batteri lattici prevedono sia la caratterizzazione fenotipica che quella genotipica. I metodi fenotipici utilizzati sono l'analisi della composizione della parete cellulare e il fingerprinting delle proteine attraverso l'analisi delle proteine citoplasmatiche totali solubili e l'analisi elettroforetica di alcuni enzimi. A livello molecolare la distinzione è basata sull'analisi dell'omologia DNA/DNA come metodo di riferimento. Accanto a questo oggi possono essere impiegate tecniche di recente acquisizione basate sulla reazione a catena della DNA polimerasi prese in esame nel capitolo precedentemente.

Dal punto di vista metabolico, il genere *Lactobacillus* è diviso in tre gruppi:

- *Lattobacilli omofermentanti obbligati*: questo gruppo è costituito da lattobacilli che fermentano gli esosi attraverso la via di Embden-Meyerhof producendo esclusivamente acido lattico, in ragione di 2 moli di acido lattico per ogni mole di carboidrato fermentata. Non sono in grado di fermentare pentosi, e non producono gas. Tuttavia possono produrre quantità molto piccole di acetato, CO<sub>2</sub> e acetoino dalla carbossilazione del piruvato (Schlegel, 1976).

Sulla base della minore o maggiore omologia DNA/DNA, all'interno del gruppo degli omofermentanti obbligati si possono distinguere due sottogruppi di specie correlate fra loro e diverse specie singole, che non hanno alcuna particolare correlazione con altre.

All'interno di questo raggruppamento si trovano diverse specie d'interesse per il settore lattiero-caseario, perciò di seguito ne viene data una breve descrizione. Al primo dei sottogruppi in cui si possono dividere i lattobacilli omofermentanti appartengono le tre sottospecie di *Lactobacillus delbrueckii*, ossia *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, che hanno un grado di omologia DNA/DNA superiore all'80%, producono acido D-lattico, sono incapaci di crescere a 15°C e si differenziano essenzialmente per il tipo di carboidrati fermentati. In particolare *L. delbrueckii* subsp. *lactis* è la specie con il profilo fermentativo più ampio (ad esempio, a differenza delle altre due specie, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* è in grado di fermentare il maltosio, zucchero presente nella farina che può essere metabolizzato solo da alcuni ceppi di *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* e da nessun ceppo di *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). *L. delbrueckii* subsp. *lactis* è probabilmente il progenitore comune di diverse altre specie, derivate dalla prima per adattamento ad un substrato particolare. E' inoltre la specie più termofila,

capace di vivere anche a 52°C. Il secondo sottogruppo è caratterizzato da una maggiore eterogeneità a livello genetico ed è rappresentato dalla specie *Lactobacillus acidophilus*, che produce acido lattico nelle forme D e L, è in grado di fermentare il maltosio e l'amido, non cresce a 15°C. La specie più affine a *Lactobacillus acidophilus*, per contenuto percentuale di guanina e citosina (GC) del DNA, stesso tipo di acido lattico prodotto, e incapacità di crescere a 15°C, è *Lactobacillus helveticus*, microrganismo di particolare interesse lattiero-caseario.

- *Lattobacilli eterofermentanti facoltativi*: i batteri lattici appartenenti a questo raggruppamento fermentano gli esosi attraverso la via di Embden-Meyerhof producendo acido lattico come gli omofermentanti; però sono inoltre in grado di fermentare i pentosi ad acido lattico e acido acetico possedendo una fosfochetolasi inducibile. Rappresentano gli *Streptobatteri* di Orla-Jensen, microrganismi mesofili con temperature ottimali di crescita comprese tra 30 e 37°C. Questo è un gruppo molto eterogeneo, i cui principali rappresentanti di interesse caseario sono *Lactobacillus casei* e *L. curvatus*. *L. casei* comprende quattro sottospecie: *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *L. casei* subsp. *rahamnosus* e *L. casei* subsp. *tolerans*. Tutte le sottospecie crescono a 15°C ma non a 45°C con l'eccezione

di *L. casei* subsp. *ramnosus*, che è l'unico a crescere bene sia a 15 che a 45°C. *L. casei* subsp. *tolerans* invece può sopravvivere per 40 secondi a 72°C, ma è anche quello che fermenta il minor numero di carboidrati, mentre i profili fermentativi delle altre tre sottospecie sono piuttosto simili. *Lactobacillus curvatus* prende il nome dalla forma delle proprie cellule, non cresce a 45°C ma a 15°C e alcuni ceppi sono addirittura in grado di crescere a 2-4 °C. Produce acido lattico nelle forme D e L ed è stato isolato dalla pasta acida del pane (Vogel *et al.*, 1996), dal latte, dagli insilati e dai prodotti a base di carne.

- *Lattobacilli eterofermentanti obbligati*: i batteri con questo metabolismo fermentano gli esosi attraverso la via del pentofosfato producendo acido lattico, CO<sub>2</sub> e acido acetico e/o alcool etilico in quantità equimolare (1 mole di acido lattico, 1 mole CO<sub>2</sub> e 1 mole di acido acetico/alcol etilico per ogni mole di zucchero fermentata). Sono capaci di fermentare anche i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. Tutte le specie appartenenti a questo gruppo producono acido lattico in entrambe le forme, D e L, tranne *Lactobacillus fructosus*, che produce quasi esclusivamente D acido lattico. Per *Lactobacillus divergens* che produce acido lattico in forma L è stato descritto da Collins *et al.* (1987) un nuovo genere di appartenenza, *Carnobacterium*. In generale i lattobacilli eterofermentanti obbligati costituiscono un

gruppo molto eterogeneo, sia per quanto riguarda i profili fermentativi, sia per il livello di omologia DNA/DNA, sia per la percentuale di GC. Le uniche due specie più vicine dal punto di vista dell'omologia DNA/DNA (40%) sono *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus buchneri*.

I lattobacilli più comunemente ritrovati nell'ambiente lattiero-caseario sono lattobacilli termofili quali *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis* e *L. helveticus*, in grado di svilupparsi a temperature di 45°C e più, e caratterizzate da una velocità di acidificazione e produzione di acido lattico. Possono essere distinti in relazione al tipo di fonte di carbonio utilizzata e dall'isomero di acido lattico prodotto.

*L. acidophilus* viene impiegato soprattutto nella produzione di prodotti a base di latte fermentato per le sue caratteristiche probiotiche; *L. casei* ed *L. plantarum* a volte in associazione con *L. curvatus* possono venire ritrovati in colture artigianali, nella fase di maturazione del formaggio. A volte, in alcune colture artigianali, è possibile ritrovare anche *L. fermentum*, che possiede un discreto grado di termofilia.

I lattobacilli citati sono i principali rappresentanti dei siero-innesti naturali per la produzione di Grana Padano, Provolone e altri formaggi a pasta cotta, come l'Emmenthal, in questo caso in associazione con i batteri propionici.

Tutti questi processi fermentativi attualmente non vengono più lasciati al caso, ma vengono gestiti mediante l'impiego di innesti selezionati, fatti di colture ben conosciute, con proprietà biochimiche ben

definite e che perciò consentano di ottenere risultati ripetibili e costanti nel tempo. Nella tabella successiva (tab. 1) vengono riportati i più importanti lattobacilli utilizzati nell'industria lattiero-casearia.

<b><i>Specie</i></b>	<b><i>Caratteristiche</i></b>	<b><i>Impiego</i></b>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Omofermentante obbligato	Utilizzato come starter nel settore caseario. La sua intensa attività proteolitica è sfruttata per incrementare l'aroma nei formaggi.
<i>Lactobacillus lactis</i>	Omofermentante obbligato	Utilizzato come starter nell'industria casearia. Sfruttato per l'attività proteolitica.
<i>Lactobacillus casei</i>	Eterofermentante facoltativo	Utilizzato come starter per la produzione di prodotti a base di

		latte fermentato.
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Omofermentante facoltativo	Utilizzato come starter per la produzione di lattici fermentati.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Omofermentante obbligato	Utilizzato come starter nella produzione casearia (formaggi e yogurt). Notevole la sua attività proteolitica.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Omofermentante obbligato	Utilizzato come starter per la produzione di lattici fermentati e burro.
<i>Lactobacillus kefir</i>	Eterofermentante obbligato	Utilizzato come starter per la produzione della bevanda kefir

---

**Tabella 1. Lattobacilli di maggiore interesse per il settore lattiero caseario.**

## 4.2 La specie *Lactobacillus helveticus*

*Lactobacillus helveticus* è una specie di grande interesse applicativo nel settore lattiero-caseario in quanto viene impiegato come specie dominante nei sieroinnesti naturali per la produzione di formaggi di qualità come Grana, Provolone, Emmenthal, Asiago e Pecorino. Inoltre la sua presenza è stata rilevata anche in formaggi piemontesi tradizionali come

Bra e Robiola. Gli studi effettuati su questa specie microbica hanno mostrato che esiste un'ampia variabilità biotecnologica tra ceppi isolati da vari sieroinnesti naturali che potrebbe essere correlata ai diversi processi di selezione ai quali i ceppi sono stati sottoposti nelle differenti nicchie ecologiche di provenienza. Per questo motivo è importante approfondire ulteriormente gli studi su questa importante specie batterica.

*L. helveticus* è una specie che presenta una elevata eterogeneità fenotipica al suo interno, che si manifesta a volte anche nell'ambito di una stessa popolazione (Giraffa *et al.*, 1998; Fortina *et al.*, 1998). Questo elevato grado di biodiversità che può comportare a volte dei problemi identificativi rispetto a specie strettamente correlate, è d'altro canto di grande significato applicativo. Esiste infatti la possibilità di disporre di biotipi specifici che si caratterizzano ad esempio per una spiccata attività acidificante, proteolitica e peptidasica, o per un più alto grado di resistenza al lisozima e a particolari antibiotici (Fortina *et al.*, 1990; Reinheimer *et al.*, 1995; Fortina *et al.*, 1998).

I dati relativi allo studio di differenti fonti di carbonio hanno evidenziato che, mentre glucosio, galattosio, mannosio, lattosio e N-acetilglucosammina sono fonti caratteristiche della specie, per fruttosio, maltosio e trealosio la specie risulta non omogenea, con biotipi positivi a tutte e tre le fonti di carbonio in questione, biotipi positivi soltanto a uno o due zuccheri o biotipi negativi.

Per quanto riguarda l'attività proteolitica e peptidasica di *L. helveticus* è possibile riscontrare i biotipi più diversi, con ceppi altamente proteolitici

e con scarsa attività peptidasica, ceppi sia altamente proteolitici sia altamente peptidasici e ceppi dotati di scarsa attività proteolitica e peptidasica. La specie si è dimostrata altamente eterogenea anche per la capacità di acidificazione, con biotipi più acidificanti riscontrabili preferenzialmente tra ceppi isolati da siero-innesti per Grana piuttosto che per Provolone.

Tutti i ceppi della specie finora studiati possiedono uno strato extraparietale di natura proteica, ma sembra che la sua presenza non sia correlabile alla resistenza al lisozima. Infatti tale strato è presente sia in ceppi resistenti sia sensibili all'agente litico in questione.

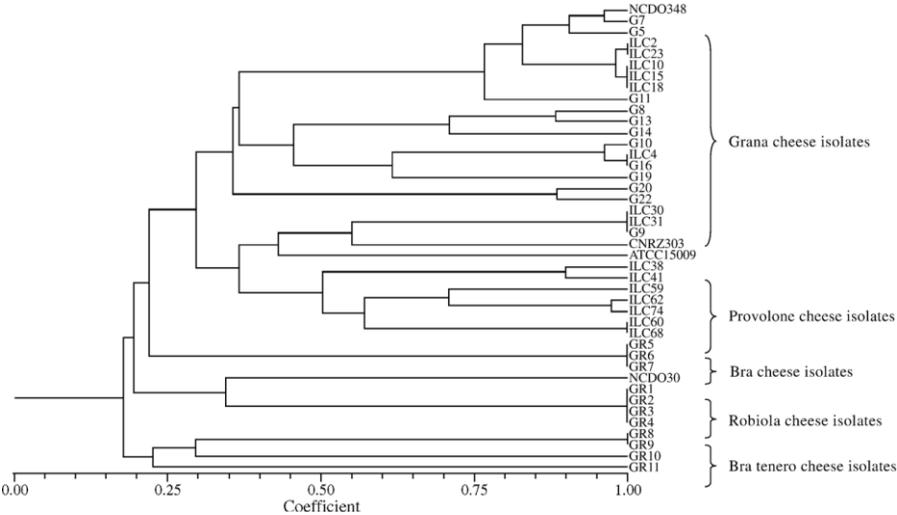
Un altro aspetto fenotipico importante è la produzione di batteriocine (Vaughan *et al.*, 1992; Joerger & Klenhammer, 1996). Quella più studiata è l'elvetica prodotta da ceppi selezionati di *L. helveticus*, ma recenti studi hanno dimostrato che diversi altri ceppi sono in grado di produrre anche batteriocine diverse, le cui caratteristiche potrebbero meglio essere impiegate in diversi processi di conservazione naturale degli alimenti o per la produzione di biofilm.

Per quanto riguarda gli studi di biotipizzazione genotipica finora condotti, è possibile affermare che i ceppi ascrivibili alla specie *L. helveticus* formano un gruppo geneticamente omogeneo e non correlato ad altri lattobacilli termofili come *L. delbruecki*, *L. acidophilus* e *L. gasseri*, con un valore di % GC tra 30 e 40 mol% e un grado di omologia genetica compreso tra 78 e 100%.

Tuttavia questa specie è caratterizzata da un notevole grado di variabilità genetica, non sempre correlabile direttamente ad una specifica manifestazione fenotipica, ma che può essere sfruttata per ottenere fingerprint ceppo-specifici, con i quali poter seguire ad esempio l'evoluzione di particolari biotipi in un dato prodotto.

Sono diversi i dati bibliografici relativi alla differenziazione a livello di ceppo di *L. helveticus* tramite la messa a punto di tecniche di ribotyping e di RAPD-PCR che hanno consentito in alcuni casi di ottenere per determinati ceppi specifici fingerprints, e per altri dei raggruppamenti omogenei in molti casi riconducibili all'habitat di provenienza o alle tecnologie produttive in cui erano impiegati (Dykes & Von Holy, 1994; Drake et al., 1996; Giraffa *et al.*, 1998; Giraffa *et al.*, 2000, Borgo *et al.*, 2007). Recentemente nei nostri laboratori lo studio delle sequenze d'inserzione (IS) ha permesso il raggruppamento di ceppi di *L. helveticus* in funzione della loro nicchia di isolamento (Ricci & Fortina, 2006). Questi risultati mostrano come le differenze genetiche di *L. helveticus* non siano portate solo a livello del gene 16S rDNA o dei plasmidi ma che siano riscontrabili lungo l'intero genoma. Il dendrogramma (Fig. 1) mostra il raggruppamento dei ceppi di *L. helveticus* isolati da differenti nicchie ecologiche in funzione della distribuzione delle sequenze d'inserzione ISLh1, IS1201 e ISL2 determinate lungo il genoma batterico. La natura e il significato di queste differenze genetiche non è chiaro, ma potrebbe essere determinato da eventi di "micro-evoluzione" che avvengono quando la comunità batterica è soggetta a selezioni ambientali o di processo.

4. Differenti ecotipi di *Lactobacillus helveticus*



**Figura 1. Raggruppamento dei ceppi di *Lactobacillus helveticus* studiati in funzione della distribuzione delle sequenze d'inserzione ISLh1, IS1201 e ISL2 lungo il genoma batterico. Il dendrogramma è stato costruito utilizzando il programma UPGMA attraverso il coefficiente di associazione di Dice. La correlazione cofonetica del dendrogramma è del 93%**

Inoltre è stato individuato e caratterizzato il cluster genico relativo all'utilizzazione del lattosio, non ancora noto per la specie *L. helveticus* (Fortina *et al.*, 2003). Il cluster (Fig. 2), studiato per il ceppo type della specie, è costituito da due geni, parzialmente sovrapposti, codificanti per una  $\beta$ -galattosidasi (*lacL*, *lacM*), a cui segue un gene codificante per una UDPgalattosio 4-epimerasi (*galE*). In direzione opposta, è stato individuato un gene regolatore dell'attività  $\beta$ -galattosidasica (*lacR*), seguito dal gene codificante per una lattosio-permeasi (*lacS*). Nei nostri laboratori, di questi geni, è stato possibile ottenere la sequenza nucleotidica completa (depositata presso la EMBL Nucleotide Sequence Database), l'individuazione di specifiche regioni regolatrici, quali il promotore e il terminatore. La localizzazione dei geni coinvolti e la loro organizzazione è diversa da quanto riportato per le altre specie di batteri lattici finora studiate. L'attività codificata da *galE* fa parte di un pool di enzimi relativi alla utilizzazione del galattosio attraverso la via di Leloir, che solitamente sono codificati da un insieme di geni costituenti l'operone galattosio. A tutt'oggi questa è la prima segnalazione di un gene codificante per un enzima della via di Leloir presente all'interno di un operone lattosio.

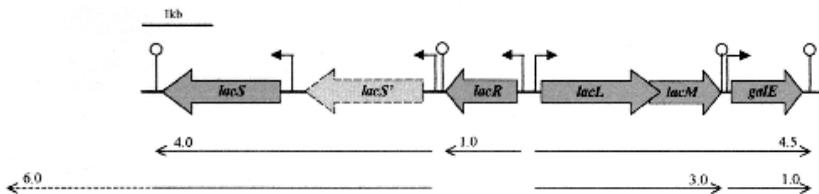


Figura 2. Organizzazione dei geni coinvolti nell'utilizzo del lattosio in *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup>. Le frecce grigie indicano la localizzazione dei geni (è indicata la direzione della trascrizione). Sono indicate le posizioni dei potenziali promotori e dei terminatori. La direzione della trascrizione è indicata con delle linee con frecce all'apice, viene indicata la lunghezza stimata in kilobase.

### 4.3 *Lactobacillus helveticus* nelle produzioni casearie italiane

*Lactobacillus helveticus* viene utilizzato come siero-innesto naturale per la produzione di alcuni formaggi tipici italiani, quali il Grana Padano e il Provolone.

I microrganismi dell'innesto determinano l'acidificazione rapida della cagliata, e unitamente alle modalità di conduzione della lavorazione del latte in caldaia, condizionano lo spurgo del siero e l'umidità del formaggio nel quale i microrganismi, durante la stagionatura, in seguito a lisi cellulare,

rilasciano nella pasta del formaggio enzimi intracellulari ed intervengono nei processi di maturazione.

La popolazione batterica dei siero-innesti si sviluppa per selezione rispetto a quella del latte crudo, in relazione sia ai trattamenti termici che al tipo di substrato utilizzato per la preparazione.

Il siero- innesto naturale infatti è ottenuto alla temperatura prescelta da un'aliquota del siero residuo dalla caseificazione del latte. La cottura della cagliata determina la prima selezione dell'ecosistema microbico del latte di caldaia, che a sua volta deriva dalla sommatoria di quello del latte crudo con quello dell'innesto aggiunto in lavorazione (Neviani *et al.*, 1998).

In relazione alla specifica tecnologia scelta dal casaro, il siero di fine caseificazione presenta una propria temperatura iniziale, una sua composizione chimica, caratterizzata dalla presenza di sostanze nutritive non disponibili come tali nel latte e una specifica popolazione microbica differenziabile sia in specie batteriche che in biotipi.

La selezione batterica che si verifica nel siero-innesto è quindi un evento indotto, determinato sia dalla temperatura di cottura della cagliata che dal successivo processo di raffreddamento del siero.

Si può ipotizzare che le differenti pressioni ambientali quali le tecnologie di produzione portino alla differenziazione di biotipi all'interno delle stessa specie, che possono essere definiti funzionali per l'ottenimento di un determinato prodotto caseario.

Di seguito vengono schematicamente riportate le diverse tecnologie di produzione del Grana Padano e del Provolone che possono costituire



delle nicchie ecologiche all'interno delle quali si sono evidenziati biotipi funzionali in relazione all'habitat d'isolamento.

Il Grana Padano è un formaggio DOP che, come prevede il Disciplinare Produttivo, deve essere prodotto con latte crudo di vacca, proveniente da non più di due munte giornaliere e prodotto solo in caseifici autorizzati.

È un formaggio semigrasso a pasta dura, cotta ed a lenta maturazione, prodotto con coagulo ad acidità di fermentazione, da latte di vacca la cui alimentazione base è costituita di foraggi verdi o conservati, proveniente da due mungiture giornaliere, riposato e parzialmente scremato per affioramento. Si fabbrica durante tutto l'anno. Il latte parzialmente scremato per affioramento è trasferito in caldaie tradizionali in rame a doppio fondo e si aggiunge il siero-innesto naturale.

Questo starter è costituito da una coltura naturale di batteri lattici che si sviluppano nel siero proveniente dalla precedente caseificazione. Il latte inoculato viene riscaldato a 31-33 °C, addizionato di caglio di vitello per la coagulazione.

La cagliata è rotta e cotta tra i 53 e 56 °C sotto agitazione. Interrotto il riscaldamento, i granuli di cagliata si depositano sul fondo della caldaia dove si aggregano e sono mantenuti per 30-70 min sotto il siero ad una temperatura non superiore a quella di fine cottura.

La massa caseosa è lasciata sostare sul fondo della caldaia 45-60 minuti, perché possa rassodare.

Giunto il momento dell'estrazione, gli operatori, usando una pala e un telo ("schiavino"), sollevano la forma all'interno della caldaia in modo da poterla dividere in due parti uguali - le due "forme gemelle" -, ognuna delle quali viene avvolta in una tela di canapa o di iuta e posta sullo spersore.

A questo punto ogni nuova forma viene racchiusa in una "fascera", un tempo di legno, oggi di teflon, tenuta ben stretta e pressata da un pesante disco dello stesso materiale, perché possa liberarsi del siero e assestarsi nella tradizionale forma arrotondata.

Dopo 2 giorni dalla produzione il formaggio, che ha assunto nelle fascere la caratteristica forma cilindrica, si immerge in una soluzione di acqua e sale per la salatura della pasta.

L'operazione ha una durata variabile, normalmente compresa tra 16 e 25 giorni, in funzione del tipo di salina, della dimensione delle forme, del livello di salatura richiesta.

Alla fine della salatura le forme passano in un ambiente adatto alla asciugatura, prima di essere inviate in magazzino per la stagionatura.

La stagionatura avviene in ambienti ben coibentati, dotati di moderni sistemi di controllo della temperatura, dell'umidità e della aerazione necessaria.

Durante il lungo periodo della stagionatura, il Grana Padano subisce una serie di mutamenti fisici, chimici e microbiologici che si riflettono sulle sue caratteristiche organolettiche.



Il Provolone è un formaggio a pasta semidura, stagionato, ottenuto da latte vaccino intero ad

acidità naturale di fermentazione, a crosta liscia, salvo le insenature dovute al passaggio delle corde. La zona tipica di produzione abbraccia tutto o parte del territorio delle province di Cremona, Brescia, Bergamo, Mantova, Milano, Lodi, Piacenza, Verona, Vicenza, Rovigo, Padova spingendosi fino alla bassa provincia di Trento.

Con decreto del 9/4/1993, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale del 21/8/1993, il formaggio Provolone Valpadana ha ottenuto la denominazione di origine; nel 1994 il Consorzio ha presentato, attraverso il Ministero delle Risorse agricole, alimentari e forestali ed ai sensi del Reg. CEE 2081/92, la domanda per l'ottenimento della Denominazione Origine Protetta. In data 21/6/1996 con Regolamento n. 1107 l'Unione Europea ha riconosciuto al Provolone Valpadana i requisiti per fregiarsi di questo riconoscimento.

Il Provolone viene prodotto a partire da latte crudo innestato con fermenti lattici termofili, ad elevato potere acidificante, per ottenere una progressiva acidificazione del latte e della cagliata. Pur essendo prodotto in moderni stabilimenti caseari non ha perduto la sua connotazione di formaggio artigianale; infatti, la sua tecnologia non ha riscontro in nessun altro formaggio del mondo. La caratteristica principale che deve avere la cagliata è l'acidità piuttosto spinta, che facilita il processo di filatura determinando una pasta molto elastica e resistente all'allungamento.

I principi della tecnologia del Provolone si basano su alcuni capisaldi caratteristici: acidificazione ottenuta, per via fermentativa, con l'aggiunta di sieroinnesti; coagulazione mediante l'uso di caglio; spurgo ed acidificazione della cagliata (maturazione) per esaltare la plasticità della

pasta; filatura della pasta fino ad ottenere una massa fibrosa elastica (immersione in liquido a 80-90 °C e filatura a mano o a macchina); formatura e raffreddamento (in acqua a 2-4 °C); stagionatura in ambienti a temperature adatte ad esaltare le reazioni lipo-proteolitiche che formano i caratteristici composti dell'aroma e del sapore.

La tecnica di produzione, imposta dalla legge, è applicata e rispettata per conservare tutte quelle caratteristiche di gusto e sapore che lo distinguono dagli altri formag

#### **4.4 Lo studio del polimorfismo genetico in *L. helveticus* attraverso la Multilocus Restriction Typing (MLRT)**

Lo studio, di seguito riportato, è stato condotto su una collezione di 42 ceppi di *L. helveticus* isolati da differenti formaggi tipici italiani (Grana padano, Provolone, Robiola, Bra tenero e duro) con il duplice scopo di valutare l'utilizzo della Multilocus Restriction Typing come tecnica di typing molecolare e di ottenere informazioni circa l'eterogeneità genotipica della specie in esame.

Questa tecnica di tipizzazione molecolare è stata recentemente utilizzata per raggiungere il grado di discriminazione richiesto per capire a fondo la correlazione genotipica esistente a livello di ceppo all'interno di una specie microbica (Jones *et al.*, 2003). I singoli cloni infatti possono diversificarsi in seguito a eventi di mutazione e ricombinazione che avvengono a velocità e tempi differenti nei diversi *loci* (regione genica).

La tecnica è relativamente semplice e consta di una amplificazione specifica della regione da saggiare e successiva restrizione con differenti enzimi di restrizione (ER). Dall'analisi elettroforetica comparativa è possibile evidenziare eventuali polimorfismi presenti. Poiché tale tecnica è deduttiva, in quanto non si conosce esattamente la sequenza nucleotidica in esame, di solito si ricorre all'analisi di più *loci*, comprendendo in particolare diversi geni housekeeping.

Questa tecnica è stata utilizzata con successo in studi riguardanti *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Burkholderia cepacia* e *Neisseria meningitidis* (Muller-Graf *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2000; Coenye & LiPuma, 2002; Bennett & Cafferkey, 2003) identificando variazioni genotipiche all'interno della popolazione microbica.

In letteratura sono riportati diversi metodi molecolari per discriminare i ceppi appartenenti alla specie *L. helveticus* al fine di ottenere informazioni circa l'eterogeneità genotipica e l'esistenza di differenti biotipi. Questi metodi includono: RFLP (restriction fragment length polymorphism), PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), RAPD (random amplified polymorphic DNA) o analisi basate sullo studio dell'RNA

(ribotyping; PCR-ribotyping e sequenza dell' rDNA) (Giraffa *et al.*, 1998; Gatti *et al.*, 1999; Lombardi *et al.*, 2002; Dimitrov *et al.*, 2005). Non è stata investigata la capacità discriminante della MLRT nei confronti di *L. helveticus*.

Il lavoro, pubblicato su *International Dairy Journal*, rappresenta la prima applicazione di tale tecnica su *L. helveticus* ed ha permesso di discriminare gli isolati in funzione della loro nicchia ecologica di provenienza, permettendo di evidenziare biotipi specifici funzionali per la produzione dei diversi formaggi.

In sintesi dal punto di vista operativo sono stati ricercati con l'ausilio del database procariota EMBL (European Molecular Biology Laboratory) le sequenze di otto geni housekeeping di *L. helveticus* quali la  $\beta$ -galattosidasi (*lacLM*), la lattosio permeasi (*lacS*), la galattosio epimerasi (*galE*), il regolatore trascrizionale dell'operone lac (*lacR*), la lattato deidrogenasi (*ldhD*), la peptidasi N (*pepN*), la proteina inducibile da stress (*htrA*) e l'S-layer (*s-layer*).

Prima di disegnare lungo le sequenze di questi geni, i primers da utilizzare nella successiva fase di amplificazione *via* PCR, sono state condotte prove di omologia di sequenza attraverso FASTA (Pearson & Lipman, 1988) con il fine di verificare l'assenza di significative omologie con le sequenze di altri geni lungo il genoma di *L. helveticus*. All'interno delle regioni maggiormente conservate di questi geni sono state disegnate le coppie di primers, le cui sequenze sono riportate nell'articolo che segue, da utilizzare nella successiva fase di amplificazione. Il prodotto delle

amplificazioni è stato sottoposto a digestione con differenti enzimi di restrizione.

La corsa elettroforetica in gel d'agarosio ha permesso la visualizzazione dei differenti profili di restrizione. In particolare i ceppi isolati da Grana hanno mostrato profili di restrizione differenti e non riconducibili a quelli relativi agli isolati da Provolone, ciò potrebbe essere determinato dalla pressione selettiva che i processi tecnologici dei due diversi formaggi esercitano sulla specie *L. helveticus*.

Parallelamente sono state condotte amplificazioni con primers universali del gene 16S rRNA di tutti i ceppi in esame. Gli amplificati sono stati sottoposti ad analisi ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Vanechoutte *et al.*, 1992).

Le digestioni sono state condotte usando come enzimi di restrizione *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *RsaI* (4 basi), *HinfI* (5 basi) e *PstI* (6 basi); i profili così ottenuti sono stati visualizzati con elettroforesi in gel d'agarosio mostrando come tutti i ceppi avessero lo stesso profilo di digestione. Questo risultato conferma come gli isolati in esame siano filogeneticamente correlati. Inaspettato è stato il profilo di digestione ottenuto con un enzima di restrizione a 5 basi, il quale ha permesso di suddividere gli isolati in due gruppi ma non riconducibili alla nicchia di isolamento.

I risultati ottenuti con queste due tecniche molecolari (MLRT e ARDRA) sono stati analizzati attraverso la costruzione di un dendrogramma usando il programma NTSYSpc con il coefficiente di similarità di Jacard.

Nelle seguenti pagine sono riportati i relativi dendrogrammi, ciò che si evince è l'alto grado di applicabilità della MLRT che ha permesso di raggruppare gli isolati in esame in funzione della loro nicchia di isolamento, risultato che non si è ottenuto con l'ARDRA.

La spiegazione possibile potrebbe risiedere nella velocità evolutiva dei geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo batterico a differenza dell'operone ribosomale.



## Multilocus restriction typing: A tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin

Francesca Borgo, Giovanni Ricci, Pier L. Manachini, M. Grazia Fortina\*

Department of Food Science and Technology, Industrial Microbiology Section, University of Milan, Via Celoria 2, Milan 20133, Italy

Received 26 October 2005; accepted 15 March 2006

### Abstract

Forty-two *Lactobacillus helveticus* strains isolated from two whey starter cultures and three cheeses were typed by multilocus restriction typing (MLRT), analyzing the restriction fragment-length polymorphism of PCR products generated from eight loci of housekeeping genes:  $\beta$ -galactosidase, lactose permease, UDP-galactose-4 epimerase,  $\beta$ -galactosidase transcriptional regulator, D-lactate dehydrogenase, peptidase N, stress-inducible protein and S-layer protein. MLRT analysis indicated wide strain heterogeneity. Strains were grouped according to their source of isolation. The low intra-species polymorphism detected in the 16S rRNA gene did not allow grouping of the strains with the same sensitivity reached by MLRT of protein-coding genes. This is the first demonstration of MLRT as a technique for the discrimination of *Lb. helveticus* strains; this technique is a promising tool to evaluate genetic diversity of related strains from different ecological niches.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** *Lactobacillus helveticus*; Dairy cultures; Cheese; MLRT; Molecular typing

### 1. Introduction

*Lactobacillus helveticus* is a homofermentative thermophilic lactic acid bacterium (LAB) extensively used in food fermentation and frequently isolated from many semihard and hard cheeses. In particular, it is the prevalent species recovered from natural lactic starter cultures used for the production of typical Italian cheeses such as Grana and Provolone (Lombardi et al., 2002).

Some interesting characteristics of this microorganism are the ability to produce high quantities of lactic acid in milk, its acid tolerance and its capacity to express a complex proteolytic enzyme pathway. This enzyme pathway, which comprises proteinases, endopeptidases and exopeptidases, plays an important role in decreasing ripening time, in the acceleration of flavor development and in the reduction of bitterness (El Abboudi et al., 1992;

Fortina, Nicastro, Carminati, Neviani, & Manachini, 1998; Fox, 1989).

Production of high-quality cheeses requires close attention to characterization, differentiation and maintenance of starter culture strains. However, this is not always an easy task, especially if only phenotypic characteristics are studied. In this regard, previous studies have shown a high degree of intra-species heterogeneity in *Lb. helveticus*: the dominant communities in various dairy starters are composed of different biotypes, which sometimes may be associated with the source of isolation. Indeed the ecological niches from which the strains are isolated can play a role in the selection of biotypes having technologically significant physiological properties (Fortina et al., 1998; Gatti, Contarini, & Neviani, 1999; Lombardi et al., 2002; Reinheimer, Morelli, Bottazzi, & Suarez, 1995).

Several molecular methods have been reported for discriminating between *Lb. helveticus* strains and for investigating whether the findings concerning phenotypic discrimination were consistent with the genotypes of the organisms. These methods include analyses of total genomic DNA restriction fragment length polymorphism

\*Corresponding author. DISTAM, Sezione di Microbiologia Industriale, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italia. Tel.: +39 02 5031 6692; fax: +39 02 5031 6694.

E-mail address: [grazia.fortina@unimi.it](mailto:grazia.fortina@unimi.it) (M.G. Fortina).

(RFLP); pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) or analyses based on ribosomal RNA genes (ribotyping; PCR-ribotyping; rDNA sequence) (Dimitrov, Michaylova, & Mincova, 2005; Giraffa, De Vecchi, Rossi, Nicastro, & Fortina, 1998; Giraffa, Gatti, Rossetti, Senini, & Neviani, 2000; Lombardi et al., 2002).

Recently it has been suggested that analyzing ordinary metabolic genes could provide a finer phylogenetic resolution when studying bacterial diversity (Palys, Nakamura, & Cohan, 1997). The multilocus restriction typing (MLRT) involves a restriction analysis of PCR products generated from several loci of selected housekeeping genes. This method, which has been explored in studies of *Streptococcus pneumoniae* and *Helicobacter pylori* (Han et al., 2000; Muller-Graf et al., 1999), seems to provide a good basis for estimating overall levels of genotypic variation in population of microorganisms (Bennett & Cafferkey, 2003; Coenye & LiPuma, 2002).

The aim of this study was to evaluate the use of MLRT for typing of *Lb. helveticus* isolates collected from different dairy products, in order to obtain information on the genotypic heterogeneity of *Lb. helveticus* species and to determine if there is an association between the sources of isolation of strains and the genetic distances estimated by MLRT.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

A total of 42 *Lb. helveticus* strains were examined in this study; 22 strains were isolated from Grana cheese starters (ILC2, ILC4, ILC10, ILC15, ILC18, ILC23, ILC30, ILC31, G1, G2, G5, G7, G8, G9, G10, G11, G13, G14, G16, G19, G20, G22), 7 from Provolone cheese starters (ILC38, ILC41, ILC59, ILC60, ILC68, ILC74), 4 from Robiola cheese (GR1, GR2, GR3, GR4), 3 from Bra cheese (GR5, GR6, GR7) and 4 from Bra Tenero cheese (GR8, GR9, GR10, GR11). Two reference strains, *Lb. helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup> and *Lb. helveticus* CNRZ 303 were also included.

The strains were grown in MRS broth (Difco, Detroit, USA) at 42 °C for 24 h, unless indicated otherwise. Strains were maintained as frozen cultures at –80 °C in the presence of 15% glycerol. Working cultures were prepared from frozen stocks through two transfers in MRS broth.

### 2.2. DNA preparation

Total DNAs of each strain were extracted from 100 µL samples of fresh overnight MRS broth cultures under the conditions described by Fortina et al. (1990). Cells were pelleted by centrifugation at 12 000 × g for 5 min at 4 °C, washed twice and re-pelleted by centrifugation. Total DNA was extracted by a standard alkaline lysis method as

previously described (Fortina, Ricci, Mora, Parini, & Manachini, 2001).

### 2.3. Gene targets, PCR primers and cycling conditions

To discriminate genetic subpopulations of *Lb. helveticus* strains, a multilocus typing analysis was followed. In this regard, the genes encoding for β-galactosidase (*lacLM*), lactose permease (*lacS*), UDP-galactose-4 epimerase (*galE*), β-galactosidase transcriptional regulator (*lacR*), D-lactate dehydrogenase (*ldhD*), peptidase N (*pepN*), stress-inducible protein (*htrA*), and S-layer protein (*s-layer*) of *Lb. helveticus* were selected and their sequences analyzed to design primer pairs to be used in separate PCR experiments.

Before using primers in PCR experiments, their sequences were checked in the EMBL (European Molecular Biology Laboratory) prokaryotes database using the EBI (European Bioinformatics Institute) sequence homology searches, FASTA (Pearson & Lipman, 1988), to ensure that no significant matches with other genes were present.

For the genes selected PCRs were performed in a 25 µL reaction mixture containing 1 µL bacterial DNA solution obtained as above, 2.5 µL 10 × reaction buffer (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Germany), 200 µM of each dNTP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM each primer (PRIMM, Milano, Italy), and 0.5 U *Taq* polymerase (Fermentas GmbH). Amplification was carried out using a Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA). After initial denaturation for 2 min at 94 °C, 35 amplification cycles were completed, each consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at the annealing temperature of 58 °C, and 2 min at 72 °C. A final extension of 7 min at 72 °C was applied.

For the amplification of 16S rRNA genes with the primer pair reported in Table 1, the following temperature profile was employed: primary DNA denaturation step at 94 °C for 2 min followed by 5 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 50 °C and 1 min at 72 °C; 30 additional cycles of 45 s at 92 °C, 55 °C at 45 s and 1 min at 72 °C; the final extension was continued for 7 min at 72 °C.

Following amplification, 4 µL of the PCR products were subjected to electrophoresis at 5V cm<sup>-1</sup> (1% w/v agarose gel, 0.2 µg ethidium bromide mL<sup>-1</sup>) in 1 × Tris-acetate EDTA (TAE) buffer (1 × TAE: 40 mM Tris acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0).

### 2.4. MLRT

Products from each amplified locus were tested to select a suitable discriminating restriction enzyme, i.e. a panel of two or five enzymes that cut frequently along each of the amplified fragments was examined in order to clearly identify allelic variants. Overnight restriction digestion was carried out at 37 °C in a 20 µL reaction mixture containing 8 µL of the PCR product, 2 µL of 10 × incubation buffer and 10 U of one of the following restriction enzymes: *AhaI*, *CfoI*, *HincII*, *HindIII*, *HinfI*, *RsaI*, *TaqI*, *VspI* (Amersham

Table 1  
Sequences and positions of the primers used in the study

Primer	Target	Position	Amplicon size (bp)	Reference sequence accession no.	Sequence (5'→3')
B-gal F1	<i>lacLM</i>	3-23	1915	AJ512877	GCAAGCAAATATCAATTGGCT
B-gal R1		1898-1917			GTGGCATCCCCATAAATGAT
Perm Fe	<i>lacS</i>	2172-2194	1869	AJ512878	ATGCATAATCATAAAGTTCGGG
Perm Rb		4021-4040			ACCAGCTTGAATAGTACCAG
Epim Fb	<i>galE</i>	32-51	937	AJ512879	A TATCGGCTCACATGCTGTT
Epim R1		949-968			TGACTCTTGCCACTTCCA
Repr F	<i>lacR</i>	18-37	974	AJ512880	AATTGCGCTGGAATCAGGCT
Repr R		972-991			CGAAGCTTTTTGTACTA CC
LdhD F	<i>ldhD</i>	414-434	981	X66723	TATTGAAAAGACGAAGAACC
LdhD R		1375-1394			TTCTGTTCAAA GCAACTGG
PepN F1	<i>pepN</i>	472-491	2100	Z30323	GCAAATCATCGGTAGCAAT
PepN R2		2551-2571			TAATGTCCACTCTTAGTGG
HtrA F2	<i>htrA</i>	299-319	917	AJ005672	TCTTATTACGCAATGGA CCAA
HtrA R2		1196-1215			AATACCGTTCCTGAGGTTAGA
S-layer F	<i>s-layer</i>	81-100	1143	AB061775	CTGCTGCTGCTTATTACTT
S-layer R		1204-1223			CGACGCTCTT TAAAAGTCTT
16S F	16S <i>rDNA</i>	8-27	1503	*	AGAGTTTGATCTTGCTCAG
16S R		1491-1510			CTACGGCTA CCTTGTACGA

\*From *Escherichia coli* 16S rRNA (Lane, 1991).

Pharmacia Biotech., Milano, Italy). Restriction digests were subsequently analyzed by agarose electrophoresis (3%, w/v, agarose gel, containing 0.2 µg mL<sup>-1</sup> ethidium bromide, TAE buffer). The gels were run at 5 V cm<sup>-1</sup> and photographed in UV light. A Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas GmbH) was used as standard.

The 16S rRNA gene restriction digestion was carried out as described above, employing *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI*, and *RsaI* restriction enzymes.

## 2.5. Data analysis

Banding pattern similarity was evaluated by construction of a dendrogram using the NTSYSpc software, version 2.01 (Applied Biostatistics Inc., NY, USA), employing the Jaccard similarity coefficient. A dendrogram was deduced from a similarity matrix by using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPMGA) clustering algorithm. The faithfulness of the cluster analysis was estimated by calculating the cophenetic correlation value (expressed as a percentage) for each dendrogram.

## 3. Results

### 3.1. Restriction analysis of the eight gene fragments

On the basis of conserved regions identified by sequence comparison of the genes studied from *Lb. helveticus*, we selected suitable primer pairs to be used for PCR amplifications. Sequences of the primers are reported in Table 1. The expected fragment lengths of 1915, 1869, 937, 974, 981, 2100, 917 and 1143 were observed for the PCR products of the β-galactosidase, lactose permease, UDP-galactose-4 epimerase, β-galactosidase transcrip-

tion regulator, D-lactate dehydrogenase, peptidase N, stress-inducible protein, and S-layer protein genes of *Lb. helveticus*, respectively. This confirmed the effectiveness of the primer design and PCR conditions utilized. Single PCR products of the same size for each of the genes tested were obtained with each of the 42 strains examined. The method used to extract the DNA from each strain did not appear to affect the amplification of any of the eight genes examined or the subsequent restriction analysis of the products obtained.

Restriction analysis of each of the loci tested has produced one to three patterns consisting of two to eight bands ranging from approximately 50–1550 bp, depending on locus and strain examined. Restriction patterns obtained for reference strains *Lb. helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup> and CNRZ 303 after digestion of PCR-amplified regions of eight genes analyzed are reported in Table 2.

Three of the eight genes studied seem more conserved within the tested strains. Indeed, restriction analysis of *ldhD*, *lacR* and *htrA* amplified fragments with different restriction enzymes did not reveal any sequence variations among the strains.

On the contrary, different restriction patterns were observed for the other loci examined.

Restriction analysis of the *lacLM* amplified fragment with *CfoI* or *HinfI* allowed the discrimination of the strains in two different clusters. Using *CfoI* all Grana cheese isolates showed the same restriction pattern of reference strains (Table 2), while strains isolated from Provolone, Bra, Bra tenero and Robiola cheeses grouped together, with a restriction patterns characterized by two fragments of approximately 1530 and 380 bp. Restriction digestion with *HinfI* also delineated two clusters: in this case the absence of two restriction sites in the *lacLM* fragments of

Table 2  
Restriction patterns obtained for reference strains *Lb. helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup> and CNRZ 303 after digestion of PCR-amplified regions of eight genes analyzed

Genes	Amplicon size (bp)	Restriction enzyme	Restriction pattern (bp)
lacM	1915	CfoI	880, 630, 380
		HinfI	760, 530, 280, 200, 60, 60
lacS	1869	RsaI	780, 380, 180, 170, 110, 100, 90, 60
		VspI	730, 580, 380, 170
galE	937	RsaI	320, 300, 220, 110
		TaqI	520, 170, 150, 110
lacR	974	AluI	550, 390, 50
		CfoI	730, 230
		RsaI	790, 190
		TaqI	740, 170, 60
lmd	981	CfoI	500, 350, 130
		HinfI	460, 230, 180, 90
pepN	2100	HindIII	700, 620, 380, 360
		RsaI	860, 730, 290, 200
		TaqI	990, 850, 230
htrA	917	HincII	670, 250
		RsaI	290, 240, 180, 100, 80
s-layer	1143	HindIII	550, 470, 150
		RsaI	400, 290, 180, 120, 110

Provolone isolates allowed their discrimination from the other strains (resulting profile characterized by 760, 610, 280, 260 bp fragments).

All *Lb. helveticus* strains tested showed the same profile after digestion of *galE* amplified fragments with *TaqI* (Table 2). The use of *RsaI* allowed the obtaining of two different clusters. The first contained the reference strains and all isolates, with exception of Bra and Bra tenero cheese isolates, which grouped in the second cluster. Three fragments of approximately 300, 220 and 110bp were common in all strains; a fragment of about 320 bp, present in strains of cluster I was further digested in strains of cluster 2, yielding two fragments of about 160bp each.

Another polymorphism was found when the *lacS* amplified fragment was analyzed, using *RsaI* and *VspI* restriction enzymes. Based on the results obtained with these enzymes the strains were clustered in two groups. The first group was constituted by reference strains, all strains isolated from Grana, Bra and one from Bra Tenero (GR11) cheeses. The second sequence cluster included all strains isolated from Provolone, Robiola and the remaining Bra tenero cheese isolates. This last cluster showed the presence of a further restriction site for *RsaI* within the 380 bp fragment, making up two fragments of about 220 and 160 bp. On the contrary, the absence of two restriction sites for *VspI* yielded a restriction profile constituted by only three fragments (1300, 390, 190 bp).

The digestion of the 2100 amplified fragment of *pepN* gene with *RsaI* and *TaqI* did not highlight differences

within the tested strains (Table 2). The use of *HindIII* outlined three different clusters: all strains isolated from Provolone cheese clustered in the same group characterized by a 1450 and 620 bp profile approximately. The strains isolated from Grana cheese starters were placed in two different clusters. One of these was constituted by the reference strains and 12 isolates from Grana, the second contained the remaining Grana isolates and the strains isolated from Robiola, Bra and Bra Tenero cheese. In this last case, the restriction profile was characterized by three bands of 1050, 620 and 380bp approximately.

Restriction analysis of the gene encoding surface layers, carried out using *HindIII* and *RsaI*, also revealed sequence variations and the possibility to discriminate among strains isolated from Bra and Bra Tenero cheeses (470, 370, 210, 150 bp and 700, 260, 120, <50bp respectively), reference strains, Robiola and some Grana isolates (Table 2) and strains from Provolone and the remaining Grana isolates (1000, 150 bp and 320, 250, 180, 120, 110, <50bp, respectively).

### 3.2. MLRT

The cluster analysis applied to repeated restrictions of the two reference strains allowed us to verify a high level of repeatability for our restriction experiments (data not shown).

The cluster analysis resulting from the combined restriction profiles of the eight amplicons, reported in Fig. 1, revealed two distinct *Lb. helveticus* groups with a similarity level of approximately 80%. Group I contained all Provolone cheese isolates; these strains formed a well-differentiated group with an inter-strain pattern linkage level of 100%. All the other strains belonged to group II. Within this group, two main subgroups could be underlined, the first grouping all Grana cheese isolates, the second grouping Robiola, Bra and Bra tenero isolates. Within the Grana cheese subgroup a further differentiation in five clusters was observed, with an inter-strain level of similarity ranging from 90% to 98%. Within the second subgroup, the Bra cheese isolates and one strain from Bra tenero cheese (GR11) were separated from the other Bra tenero and Robiola isolates, which were grouped in two different clusters.

The cophenetic correlation coefficient (about 98%) indicated a good reliability of this cluster analysis.

### 3.3. 16S rRNA gene restriction analysis (ARDRA)

The 16S rRNA genes were amplified from all the *Lb. helveticus* isolates, and fragments of approximately 1500 bp long were consistent with the 16S rRNA genes obtained by Giraffa et al. (2000). The restriction analysis was carried out using four four-cutting enzymes: *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *RsaI*, one five-cutting enzyme *HinfI* and one six-cutting enzyme *PstI*.

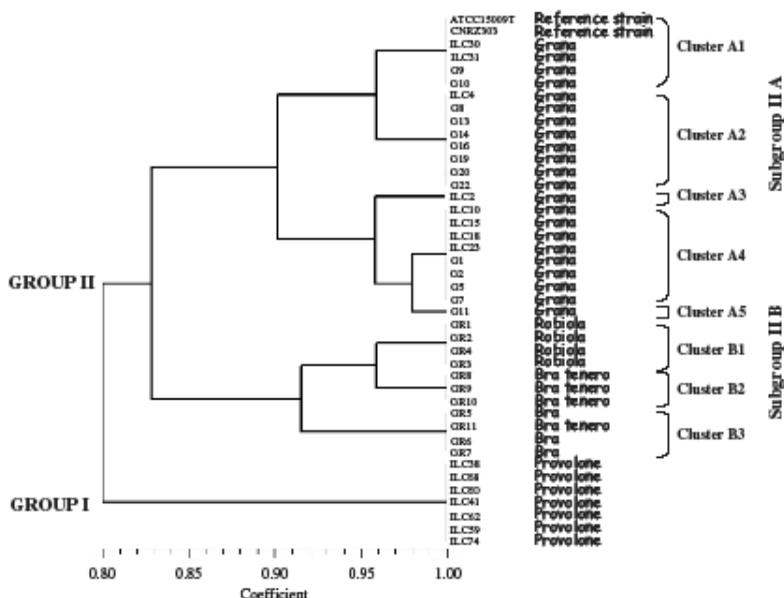


Fig. 1. Dendrogram showing the relatedness of the *Lb. helveticus* strains based on analysis of their restriction profiles generated by MLRT analysis, constructed using UPMGA algorithm in the NTSYSpc software, version 2.01 (Applied Biostatistics Inc., NY, USA), employing the Jaccard similarity coefficient.

*AhlI*, *CfoI*, *HaeIII*, *RsaI* and *PstI* did not reveal any sequence variation in the 16S rRNA gene fragments, confirming that the strains were phylogenetically closely related. An unexpected polymorphism was detected using the remaining enzyme, *HinfI*. In comparison with the expected profile of type strain (550, 380, 370, 170 bp), we identified two groups of strains (Fig. 2). For group I, who was composed of *Lb. helveticus* strains isolated from Bra cheese, three fragments of approximately 950, 380 and 170 bp long were observed. At a similarity level of 95% the strains belonging to group II were further separated in two subgroups. The first contained, together with the reference strains, all isolates from Provolone, Robiola, Bra tenero cheeses and the majority of the strains isolated from Grana cheese. The second subgroup was constituted by the remaining Grana cheese isolates, characterized by the presence of a further restriction site (Fig. 2, lane IIB).

#### 4. Discussion

Previous studies have shown the presence in natural cultures of several biotypes of *Lb. helveticus* characterized by substantial differences in phenotypic and genotypic properties. This observed discrimination has been sometimes correlated with the different dairy niches from which

the strains were isolated: the different manufacturing conditions used for the different kinds of cheeses may have directly led to the selection of particular biotypes, giving a range of certain biochemical and technological properties.

In this study, 42 strains of *Lb. helveticus* were characterized using MLRT, a DNA-RFLP-based method, with the purpose of evaluating MLRT as a technique for *Lb. helveticus* strain discrimination. This is the first use of MLRT as a technique for the discrimination of *Lb. helveticus*, but it has been documented for the analysis of *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori* and has been used for the molecular typing of *Lb. delbrueckii* of dairy origin (Giraffa et al., 2003).

MLRT divided the 42 *Lb. helveticus* strains into different groups based on the combination of restriction patterns observed at each of the eight loci examined. Although discrimination is based on the analysis of banding patterns on agarose gels, patterns were easy to analyze and recognize because only two to three different patterns were observed for each locus, containing only a small number of bands (two to eight) in each pattern. Greater allelic variation was observed with the *lacLM*, *galE*, *lacS*, *pepN* and *s-layer* loci than with the *ldhD*, *lacR* and *htrA* loci, suggesting that the latter were more conserved, and that a

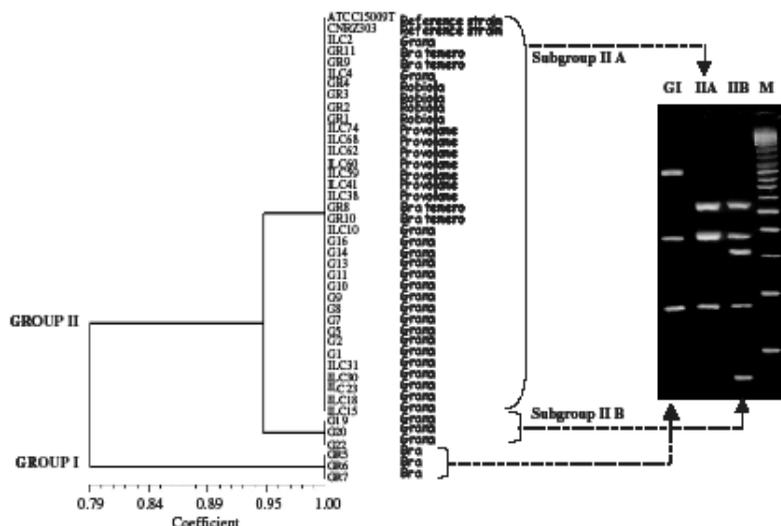


Fig. 2. Dendrogram showing the relatedness of the *Lb. helveticus* strains based on analysis of their ARDRA profiles with *Hinf*I, constructed using UPMGA algorithm in the NTSYSpc software, version 2.01 (Applied Biostatistics Inc., NY, USA), employing the Jaccard similarity coefficient.

reduced MLRT analysis with the first five loci only would be sufficient to achieve the same discrimination.

An excellent association between restriction profiles and origin of the isolates was observed, except for a single strain. All *Lb. helveticus* isolates obtained from Provolone cheese starters were found in the same group, with a very high inter-strain pattern linkage level: this result confirms the extensive differences between Provolone and Grana cheese isolates previously reported (Gatti et al., 1999; Giraffa et al., 2000). The strains isolated from Grana cheese differed more at a genetic level than the strains isolated from Provolone. Although the inter-strain level of similarity was high, the 22 strains tested could be split among five clusters. This is probably due to the fact that the cheese making methods for Grana production are primarily artisan, favoring the selection of a wider range of wild biotypes. Robiola, Bra and Bra tenero cheese isolates show minor variability, but also in this case, the choice of several metabolic genes allowed for good discrimination in relation to the type of cheese.

MLRT of protein-coding genes was more effective than 16S rRNA gene restriction analysis in grouping *Lb. helveticus* strains on the basis of their origin. This fact is a consequence of the faster evolution of genes coding for proteins involved in the bacterial metabolism, than the rate of the ribosomal genes. These latter genes did not allow delineation of divergent populations within close ecosystems.

## 5. Conclusions

Although the number of strains investigated for some sources are limited, the results obtained seem to demonstrate that MLRT can be a discriminatory, reproducible and rapid typing method to characterize genetically *Lb. helveticus* isolates of different origins. In addition, the results show that DNA sequences of protein-coding genes are more effective than 16S rRNA gene for classifying the ecological diversity of bacteria.

The used approach represents a promising tool for characterizing natural dairy starter cultures and a further step toward a better understanding of the functional and ecological significance of the presence of different biotypes in these natural microbial ecosystems.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant of the Ministry of the University and Technological and Scientific Research (FIRST 2005).

## References

- Bennett, D. E., & Cafferkey, M. T. (2003). Multilocus restriction typing: A tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 781–787.

- Coenye, T., & Lipuma, J. J. (2002). Multilocus restriction typing: A novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*, *185*, 1454–1462.
- Dimitrov, Z., Michaylova, M., & Mincova, S. (2005). Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Bulgarian yoghurt, cheese, plants and human faecal samples by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of cell-wall proteins, ribotyping and pulsed field gel fingerprinting. *International Dairy Journal*, *15*, 998–1005.
- El Abboudi, M., El Soda, M., Pandian, S., Barreau, M., Trepanier, G., & Simard, R. E. (1992). Pepsinase activity in debittering and nondebittering strains of *Lactobacilli*. *International Dairy Journal*, *2*, 55–94.
- Fortina, M. G., Nicastro, G., Carminati, D., Neviani, E., & Manachini, P. L. (1998). *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: The diversity in phenotypic characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 72–80.
- Fortina, M. G., Parini, C., Manachini, P. L., Morelli, L., Bottazzi, V., & Conconi, P. (1990). Genotypic and phenotypic relationships among some strains of *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Letters*, *12*, 765–770.
- Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Parini, C., & Manachini, P. L. (2001). Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. *FEMS Microbiology Letters*, *198*, 85–89.
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, *72*, 1379–1400.
- Gatti, M., Contarini, G., & Neviani, E. (1999). Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*, 1450–1454.
- Giraffa, G., De Vecchi, P., Rossi, P., Nicastro, G., & Fortina, M. G. (1998). Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *Journal of Applied Microbiology*, *85*, 411–416.
- Giraffa, G., Gatti, M., Rossetti, L., Senini, L., & Neviani, E. (2000). Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*, 1259–1265.
- Giraffa, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D., & Neviani, E. (2003). Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal of Food Microbiology*, *82*, 163–172.
- Han, S. R., Zschausch, H.-C. E., Meyer, H.-G. W., Schneider, T., Loos, M., Bhakdi, S., et al. (2000). *Helicobacter pylori*: Clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*, 3646–3651.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackenbrandt, & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175). New York, USA: Wiley.
- Lombardi, A., Dal Maestro, L., De Dea, P., Gatti, M., Giraffa, G., & Neviani, E. (2002). A polyphasic approach to highlight genotypic and phenotypic diversities of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from dairy starter cultures and cheeses. *Journal of Dairy Research*, *69*, 139–149.
- Muller-Graf, C. D. M., Whatmore, A. M., King, S. J., Trzcinski, K., Pickering, A. P., Doherty, N., et al. (1999). Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. *Microbiology*, *145*, 3283–3293.
- Palys, T., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M. (1997). Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: The role of DNA sequence data. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *47*, 1145–1156.
- Pearson, W., & Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 2444–2448.
- Reinheimer, J. A., Morelli, V., Bottazzi, V., & Suarez, V. (1995). Phenotypic variability among cells of *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. *International Dairy Journal*, *5*, 97–103.

#### **4.5 Presenza e distribuzione di plasmidi in *L. helveticus*: un altro modo per discriminare differenti biotipi**

E' noto, da precedenti studi, che nella specie *L. helveticus* esiste un'ampia variabilità nei riguardi della presenza di plasmidi, con la possibilità di ottenere ceppi plasmid-free e ceppi che si distinguono per la diversa distribuzione di queste molecole di DNA extracromosomale, sia relativamente al numero che al diverso peso molecolare.

Per quanto riguarda lo studio relativo alla presenza, ma soprattutto al ruolo del DNA plasmidico in *L. helveticus*, molto deve essere ancora fatto. Molti plasmidi isolati da diversi ceppi rimangono al momento "criptici", sia per la difficoltà di ottenere in molti casi ceppi curati, sia per la difficoltà di reperire in banca dati alcune indicazioni relative al sequenziamento di alcuni geni a livello plasmidico.

Alcune specie di *Lactobacillus* sembra che abbiano i geni codificanti per i sistemi enzimatici di trasporto del lattosio (sistema di trasporto fosfotransferasico-fosfoenolpiruvato PEP-PTS e trasporto attivo mediato da una lattosio-permeasi) a livello del DNA plasmidico.

In *Lactobacillus casei* 64 H, ad esempio, il metabolismo del lattosio è stato associato alla presenza di un plasmide di 35 kb che codifica sia per il sistema PEP-PTS che per una  $\beta$ -fosfo-galattosidasi (Lee *et al.*, 1982).

Un altro ceppo di *L. casei* ha mostrato di possedere a livello plasmidico i geni codificanti l'enzima  $\beta$ -galattosidasi, suggerendo che il

principale meccanismo di trasporto del lattosio sia legato alla presenza di una lattosio permeasi (Flickinger *et al.*, 1986).

I batteri lattici hanno l'importante capacità di crescere in latte grazie ad un complesso sistema proteolitico (comprendente proteinasi, peptidasi, aminopeptidasi e imminopeptidasi) e ad un efficiente sistema di trasporto. Nei batteri lattici questi sistemi sono stati studiati soprattutto nell'ambito degli streptococchi e lattococchi mentre sono ancora poco conosciuti nei lattobacilli.

Proteinasi di parete purificate di *L. bulgaricus* e di *L. helveticus* sembrano principalmente codificate da geni codificati sul DNA cromosomale, anche se alcuni autori ipotizzano un legame tra presenza di plasmidi ed attività proteolitica (Morelli *et al.*, 1986; De Rossi *et al.*, 1989).

E' necessario quindi approfondire ulteriormente la presenza e il ruolo svolto dai plasmidi all'interno dei batteri lattici, aspetto non ancora molto indagato non solo in *L. helveticus*, ma in generale nei lattobacilli termofili.

Di seguito è riportato il lavoro pubblicato su *Letters in Applied Microbiology* nel quale è stata determinata la distribuzione e il profilo plasmidico di 22 ceppi di *L. helveticus* isolati da formaggi tipici italiani (Grana padano, Provolone, Robiola e Bra tenero e duro). Dopo messa a punto di un particolare protocollo di estrazione per il DNA plasmidico in esame questo è stato digerito con enzimi di restrizione al fine di valutare l'eterogeneità di tali molecole extracromosomali. I risultati hanno evidenziato come 73% dei ceppi in esame possedesse plasmidi e fra questi gli isolati da Provolone hanno mostrato il maggior numero di molecole di

DNA extracromosomale. L'analisi di restrizione ha portato alla formazione di tredici distinti cluster che, però non sono riconducibili alle differenti nicchie di isolamento.

Parallelamente sono stati studiati a livello molecolare quattro plasmidi isolati da differenti nicchie ecologiche in comparazione con due plasmidi del ceppo type di riferimento ATCC 15009<sup>T</sup> (Fortina *et al.*, 1993) per i quali è stata depositata la sequenza in banca dati (Pridmore *et al.*, 1994; Fortina & Silva, 1996; Thompson *et al.*, 1999). Le molecole plasmidiche studiate sono: pLHg4 e pLHg2 isolati da siero-innesti per Grana; pLHp1 isolato da siero-innesti per Provolone e pLHr1 isolato da siero-innesti per Robiola. Di queste 4 molecole di DNA extracromosomale è stata determinata la mappa di restrizione che successivamente è stata comparata con quella dei plasmidi pLH2 e pLH3 provenienti dal ceppo type. Sono stati inoltre condotti esperimenti di ibridazione molecolare *via* Southern Blot per individuare la presenza di uno stesso modulo replicativo. Per le due molecole plasmidiche derivanti dal siero-innesto per Grana padano è stata riscontrata un'alta omologia di mappa con il plasmide pLH3 del ceppo type ed una stessa origine di replicazione, facendoci ipotizzare che queste molecole di DNA extracromosomale di simili dimensioni, presenti in ceppi diversi, possano avere una comune origine evolutiva. Il plasmide derivante da siero-innesti per Robiola, simile per peso molecolare ai due plasmidi prima citati ha mostrato una differente mappa di restrizione suggerendo una differente linea evolutiva. Gli esperimenti d'ibridazione molecolare hanno evidenziato una relazione fra questo plasmide e il pLH2 del ceppo type, avendo il plasmide da Robiola ibridato

con la sonda costruita con la sequenza del gene che codifica per la proteina replicatrice del plasmide del ceppo di riferimento. Il plasmide isolato da siero-innesti per Provolone ha mostrato una mappa di restrizione non comparabile con gli altri plasmidi in esame e non ha dato nessun risultato con le prove d'ibridazione. Ulteriori studi a livello molecolare dovrebbero consentire di verificare la presenza di un nuovo modulo replicativo in tale plasmide.

La ricerca di seguito riportata ha evidenziato differente distribuzione ed eterogeneità molecolare in plasmidi di *L. helveticus* e differenze molecolari relative al sistema di replicazione fra i plasmidi provenienti da ceppi isolati da formaggio Grana padano e Provolone, sottolineando come la nicchia ecologica di provenienza possa anche in questo caso rappresentare un fattore selettivo importante.

Preliminari studi di sequenziamento genico, condotti sulle molecole plasmidiche allo studio non hanno ancora consentito di conoscere le informazioni geniche codificate da queste molecole di DNA extramolecolare.

#### 4. Differenti ecotipi di *Lactobacillus helveticus*

## ORIGINAL ARTICLE

**Plasmids from *Lactobacillus helveticus*: distribution and diversity among natural isolates**

G. Ricci, F. Borgo and M.G. Fortina

Industrial Microbiology Section, Department of Food Science and Microbiology, University of Milan, Milan, Italy

**Keywords**distribution, diversity, homology groups, *Lactobacillus helveticus*, plasmids**Correspondence**

Maria Grazia Fortina, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Sezione di Microbiologia Industriale, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy. E-mail: grazia.fortina@unimi.it

2005/0139: received 10 February 2005, revised and accepted 13 September 2005

doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01847.x

**Abstract**

**Aims:** To investigate the distribution and the level of diversity of extrachromosomal molecules in *Lactobacillus helveticus* strains in relation to their different ecological niches.

**Methods and Results:** The plasmid profile of 22 *Lact. helveticus* strains, isolated from five different Italian cheeses, was determined. Among the tested strains, there was a variable presence of plasmids: eight plasmid-free strains and the remaining with several plasmids that could be differentiated on the basis of number and molecular weight. The profiles showed between one and five plasmid bands, which size ranged between 2.3 and 31 kb. Four of these plasmids were further analyzed by restriction digestion and compared with the plasmids from *Lact. helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup>. Analyses and comparison of their primary structures and hybridization experiments revealed the presence of different DNA homology groups.

**Conclusions:** This study indicates that within *Lact. helveticus* species, there is a high degree of variability in relation to the presence of plasmid molecules. Moreover, the structural diversity found among some of these plasmids allows to hypothesize the presence of different evolutionary lineages.

**Significance and Impact of the Study:** Studies on plasmid distribution and diversity should be considered as an essential component in a continuing effort to explore microbial diversity as well as to understand the real role of plasmids in the flow of genetic information in natural bacterial communities.

**Introduction**

Only recently the contribution of mobile genetic elements, such as plasmids and transposons, to bacterial adaptability and diversity has been fully appreciated. In this context, the wealth of genetic information carried by plasmids, their impact in the microbial communities, and the potential of these elements to act as natural cloning vectors, have stimulated research from the biotechnological and environmental points of view.

*Lactobacillus helveticus* is an industrially important lactic acid bacterium, widely used as a starter either in selected or natural cultures to produce typical fermented milk products (Torriani *et al.* 1994; Fortina *et al.* 1997). However, the plasmid biology of this species is relatively poorly understood. Some data have

emerged over recent years, in particular on type strain. *Lact. helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup> was shown to harbour three cryptic plasmids, pLH1, pLH2 and pLH3 (Fortina *et al.* 1993) that have been later sequenced (Pridmore *et al.* 1994; Thompson *et al.* 1999). They showed to share extensive regions of identity with each other and were stably maintained and replicated, despite their cryptic nature. This fact makes them an attractive vehicle for the construction of recombinant molecules for use in lactobacilli (Thompson *et al.* 1999). There is no doubt that a further understanding of the genetic organization of this species is necessary. At the same time, there is a general lack of information about plasmid distribution, their phylogeny and diversity in relation to natural selection pressures (Arber 2000; Turner *et al.* 2002).

With this in mind, the aim of this study was to evaluate the presence and distribution of plasmids in *Lact. helveticus* strains previously isolated from different Italian cheeses. Moreover, we describe the characterization of four new plasmids by the construction of restriction maps. By comparative analyses of the structural similarity and Southern hybridization experiments with the known type strain plasmids, we assessed to what extent these plasmids had the same molecular organization.

## Materials and methods

### Bacterial strains

Twenty-two strains of *Lact. helveticus* were used: eight strains have been isolated from Grana cheese starters (GRA 1–8), three from Provolone cheese starters (PRO 1–3), four from Robiola Piemontese (ROB 1–4), three from Bra (BRA 1–3) and four from Bra Tenero cheese (BRAT 1–4), in comparison with the type strain, ATCC 15009<sup>T</sup>. All strains were maintained by biweekly transfers in MRS broth (Difco, Detroit, MI, USA) with incubation at 42°C and storage between transfers at 4°C.

### Isolation of plasmids

For plasmid DNA isolation, the alkaline extraction procedure was used as described by Anderson and McKay (1983). Agarose gel electrophoresis and evaluation of gels were performed as described by Sambrook *et al.* (1989). For each plasmid-bearing strain, a second-dimension electrophoresis of the plasmid preparation for a further analysis of CCC and OC forms was performed according to Hintermann *et al.* (1981). The molecular mass of the CCC plasmids were determined against Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Plasmids were recovered from agarose gels by a procedure of electroelution (Sambrook *et al.* 1989).

### Restriction digestion of plasmids

Purified plasmid preparations were digested with 18 restriction enzymes (*Apal*, *AvaII*, *BamHI*, *Bsu36I*, *CfoI*, *ClaI*, *HaeIII*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *MhaI*, *NsiI*, *PstI*, *PvuII*, *SphI*, *SalI*, *SspI* and *XbaI*). Enzymes were supplied by Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany) and used according to manufacturers' directions. All digests were separated by electrophoresis on agarose gels in Tris-acetate buffer (40 mmol l<sup>-1</sup> Tris-acetate, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8). For restriction mapping, the plasmids were subjected to simple, double and triple digestions with several enzymes. The molecular sizes of the plasmid fragments were determined against linear DNA ladders (Roche).

### DNA amplification procedure

Complete sequences of pLH2 and pLH3 plasmids from type strain were obtained from the EMBL database (accession numbers X81981 and X81979 respectively) and analysed to design primer pairs able to amplify their *rep* genes. According to Fridmore *et al.* (1994), we amplified the DNA regions encoding ORF1 on pLH2 (position 1408–1990, primer set F1 5' AAGGCAAGGT ACTTACACCTT 3'; R1 5' CAGCATCGAAAATACAGCCTT 3') and ORF6 on pLH3 (position 2686–2952, primer set R6 5' TTAACGGTTAGTGAATTC 3'; R6 5' AGCTT GATCTTTAATTTGCT 3'). For the amplification of the DNA region between ORF1 and ORF2 on pLH2 (position 2180–3909) we selected the following primer pairs: IRF1 5' GGGTAATGATACTTTCGCCA 3'; IRR1 5' TOGAA GCCCTTCGAATTATC 3'. All amplification reactions were performed as previously reported (Fortina *et al.* 2001). The initial denaturation at 94°C for 2 min was followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 58°C for 45 s and extension at 72°C for 1 min. The final cycles were followed by an additional 7-min elongation period at 72°C. The primers were obtained from PRIMM srl (Milan, Italy).

### Southern hybridization analysis

The PCR-amplified fragments were DIG-dUTP labelled by random priming with a labelling kit (Roche) and used as probes in hybridization experiments. Tested plasmids were digested by several restriction enzymes and the corresponding restriction fragments were separated by electrophoresis and transferred onto a Hybond-N nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italy; Sambrook *et al.* 1989). Prehybridization and hybridization overnight were performed in 50% (w/v) formamide at 42°C and stringency washes in 0.1X SSC at 65°C (1X SSC is 150 mmol l<sup>-1</sup> NaCl plus 15 mmol l<sup>-1</sup> sodium citrate). The probes were detected by chemiluminescent detection using CSPD (Roche) and the signals were visualized by exposure to X-ray film for 1 h.

## Results

### Distribution of plasmids in *Lact. helveticus* strains

Sixteen of the 22 screened strains were shown to bear plasmids. These strains included Provolone, Robiola Piemontese and Bra cheese isolates, while the remaining isolates were heterogeneous for the relative presence of plasmids. Particularly, only 50% of the isolates coming from Grana and Bra Tenero cheese showed the presence of extrachromosomal elements. It is interesting to note

(Table 1) that the isolates from Provolone cheese starters showed the higher number of plasmids, up to five different molecules with a size ranging between 6.2 and 31.0 kb. Among the isolates containing plasmids, 13 different patterns were identified and the strains were grouped accordingly. In certain cases, the strains showed a distinctive profile, so that they could easily be differentiated using this technique. In other cases, the strains

exhibited the same pattern, even if they were isolated in different times from different cheese samples.

#### Restriction analysis of plasmids

Plasmids pLHg2 (host strain GRA2), pLHg4 (host strain GRA4), pLHr1 (host strain ROB1) of 2.5, 2.5 and 2.3 kb, respectively, and pLHp1 (host strain PRO1) of 6.4 kb, were assayed by restriction digest analysis and Southern hybridization in comparison with pLH2 and pLH3 from the type strain. The plasmids were analysed with several restriction enzymes and the number and size of the generated fragments are summarized in Table 2. For each plasmid examined the sum of the lengths of all plasmid DNA restriction fragments for a given enzyme equalled the length of the undigested circular plasmid DNA. The construction of the physical maps was achieved by double and triple digestions of the plasmids themselves and of isolated fragments: this approach allowed the unambiguous alignment of all restriction fragments (Fig. 1).

Comparing the physical maps of these plasmids, it is possible to note that the restriction maps of plasmids pLHg2 and pLHg4 were very similar, so that we can presume a probable relationship between them. A further comparison between these two plasmids and pLH3 revealed undoubtedly a high relationship, with the exception of a region of approximately 900 bp, corresponding

Table 1 Plasmid profiling of *Lactobacillus helveticus* strains

Strains	No. of plasmids	Molecular weight (kb)
PRO3	5	22.3, 15.0, 13.0, 10.0, 6.2
PRO2	4	14.6, 13.0, 7.8, 6.8
PRO1	4	31.0, 14.6, 13.8, 11.7, 6.4
BRA3	3	18.0, 12.0, 8.5
BRA2	2	18.0, 12.0
GRA4	2	19.0, 2.5
GRA1; GRA3	1	18.0
GRA2	1	2.5
BRA1	1	12.0
BRAT1	1	10.0
BRAT2	1	8.0
ROB1; ROB2; ROB3; ROB4	1	2.3
GRA5; GRA6; GRA7; GRA8; BRAT3; BRAT4	0	

Table 2 Numbers and size of fragments generated by different endonuclease digestions of the four plasmids of *Lactobacillus helveticus* strains

Restriction enzymes	No. and size of fragments (kb)			
	pLHg2	pLHg4	pLHr1	pLHp1
ApaI	0	0	0	0
AvrII	(1) 2.50	(1) 2.50	0	0
BamI	0	0	(2) 2.00 + 0.30	(1) 6.40
Bsu36I	ND	ND	0	(1) 6.40
CelI	0	0	0	(1) 6.40
CfoI	(2) 1.25 + 1.25	(2) 1.25 + 1.25	(3) 1.75 + 0.40 + 0.15	ND
HaeIII	(1) 2.50	(1) 2.50	(1) 2.30	0
HincII	(1) 2.50	(1) 2.50	(3) 1.20 + 0.80 + 0.30	>80
HindIII	(2) 1.35 + 1.15	(2) 1.35 + 1.15	(1) 2.30	(3) 4.45 + 1.70 + 0.25
KpnI	(1) 2.50	(1) 2.50	0	0
MluI	0	0	0	0
NsiI	(2) 1.40 + 1.10	(2) 1.40 + 1.10	0	ND
PstI	(1) 2.50	(1) 2.50	(1) 2.30	0
PvuII	(1) 2.50	(1) 2.50	0	0
SalI	ND	ND	(1) 2.30	0
SphI	ND	ND	(1) 2.30	(3) 3.75 + 2.20 + 0.45
SspI	(1) 2.50	(1) 2.50	ND	(4) 3.90 + 1.95 + 0.40 + 0.15
XbaI	0	0	0	ND

The number of restriction sites are indicated in brackets.  
ND, not determined.

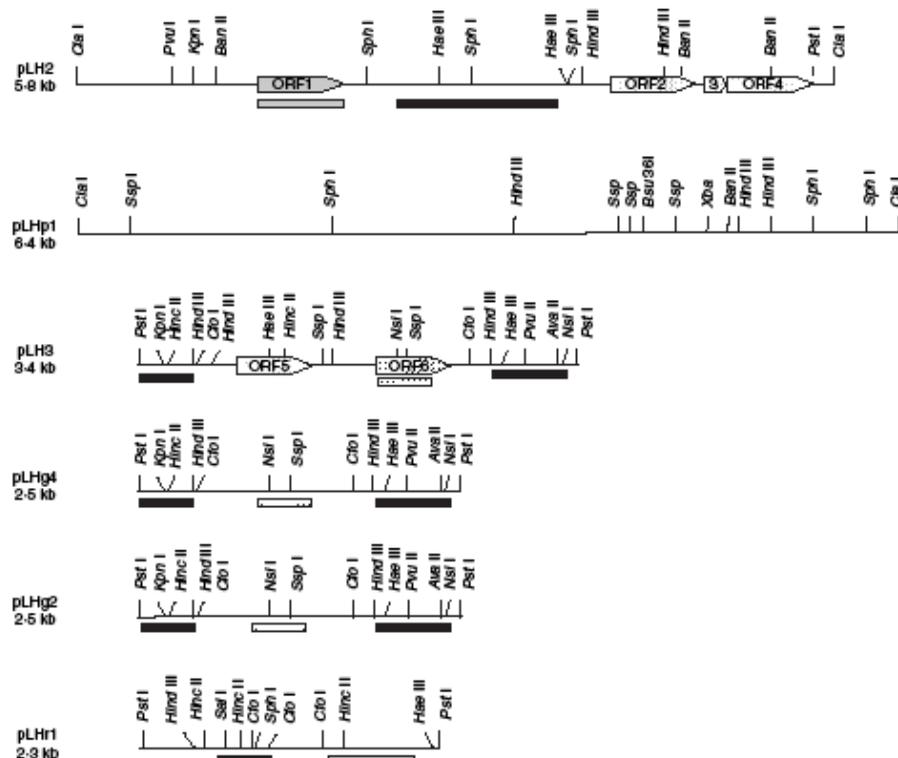


Figure 1 Restriction maps of pLH2, pLHg4, pLHr1, pLHp1 in comparison with restriction maps of pLH2 and pLH3 of the type strain and plasmid homologues. Arrows indicate the reported open reading frames (from Pridmore et al. 1994). Bars below the map indicate extent of DNA homologies among reported plasmids. Each homology bar is shaded differently to facilitate identification of the corresponding homology on the all plasmids.

to the ORF5, present only in pLH3 and coding an IS element (Mahillon and Chandler 1998). However, pLHr1, that falls in the same size group of pLHg2 and pLHg4, was different in its restriction digests, suggesting a different origin. No similarity was found between pLHp1 and pLH2 restriction maps, which suggested that these plasmids probably differed in their molecular organization.

#### Southern hybridization analysis

To investigate homologies among plasmids, we performed Southern hybridization analyses employing, as probes, the *rep* genes of pLH2 and pLH3 (Pridmore et al. 1994).

A strong homology was detected with the ORF5 of pLH3 and the C<sub>61</sub>-C<sub>61</sub> fragments of pLHg2 and pLHg4. As shown in Table 2, the regions containing the putative replicative functions were located in the same position. On the contrary, pLHr1 with 2.3 kb in size seemed related to pLH2 with 5.8 kb in size: the DNA region encoding the *rep* gene on pLH2 annealed to the 820 bp C<sub>61</sub>-HaeII fragment of pLHr1. Plasmid pLHp1 did not show homology to any of these two probes. When the DNA region comprised between ORF1 and ORF2 on pLH2 was used as probe, hybridization signals were found on all small plasmids tested; no similarities were found between this region and pLHp1 plasmid.

## Discussion

Our survey has shown the *Lact. helveticus* species to be heterogeneous in the frequencies of strains bearing plasmids, with plasmid-bearing strains being 73% of the tested strains. Furthermore, it may be worth to mention a correlation between the ecological niche of origin and the number of plasmids harboured by the isolates. Further studies on four plasmid molecules showed that they can be grouped in three different clusters of homology, on the basis of the presence of a similar replicative function. A first cluster grouped pLHg2, pLHg4, isolated from Grana cheese, and pLH3. They show not only the same *rep* gene, but also a similar molecular organization, as deduced from the restriction maps and from the presence of other regions of homology. This very close molecular correlation could presume a common origin from an ancestral plasmid. A second cluster was represented by pLHr1, isolated from Robiola cheese, and pLH2 from the type strain. Although pLHr1 falls in the same size group of the previous plasmids, it showed significant homology with the *rep* gene of pLH2 of 5.6 kb. These two plasmids have probably had a similar origin, even if, during their evolutionary course, more drastic changes occurred giving origin to distinct entities of different size. Also pLHr1, as the previously studied plasmids, shows hybridization signals corresponding to pLH2 ORF1-ORF2 intergenic region. The presence of this region of homology among *Lact. helveticus* plasmids have already been evidenced (Pridmore et al. 1994; Thompson et al. 1999), but its function remains to be determined. It has been hypothesized that this region could have the potential to facilitate recombination-dependent events between plasmids. The last cluster was represented by pLHp1, coming from a Provolone isolate; this plasmid seems particular as it does not show any similarity with all studied plasmids. The absence of homology with the *rep* genes of pLH2 and pLH3 indicated that pLHp1 uses a different system for plasmid replication in *Lact. helveticus*, not yet investigated.

In conclusion, our data show a high level of diversity among the plasmids of *Lact. helveticus*; this characteristic seems typical of the species, in contrast with the extremely low levels of diversity found among *Bacillus* plasmids (Zawadzki et al. 1996). The different conditions of relatively high selective pressure in its habitat could have led *Lact. helveticus* species and also its plasmids to a high phylogenetic diversification. Further studies on these molecules will permit to understand not only the role of these cryptic plasmids, but also to evaluate the correspondence,

in the recent phylogenetic history, between chromosomal and plasmidic DNA of strains isolated from different ecosystems.

## References

- Anderson, D.G. and McKay, L.L. (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* **46**, 549–552.
- Arber, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 1–7.
- Fortina, M.G., Parini, C., Rossi, P. and Manachini, P.L. (1993) Mapping of three plasmids from *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Let Appl Microbiol* **17**, 303–306.
- Fortina, M.G., Nicastro, G., Carminati, D., Neviani, E. and Manachini, P.L. (1997) *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *J Appl Microbiol* **84**, 72–80.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D., Parini, C. and Manachini, P.L. (2001) Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with *pepC*, *pepN* and *htrA* targeted primers. *FEMS Microbiol Lett* **198**, 85–89.
- Hintermann, G., Fischer, H.M., Cramer, R. and Hutter, R. (1981) Simple procedure for distinguishing COC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* **5**, 371–373.
- Mahillon, J. and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 725–774.
- Pridmore, D., Stefanova, T. and Mollet, B. (1994) Cryptic plasmids from *Lactobacillus helveticus* and their evolutionary relationship. *FEMS Microbiol Lett* **124**, 301–306.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Thompson, J.K., Foley, S., McConville, K.J., Nicholson, C., Collins, M.A. and Pridmore, R.D. (1999) Complete sequence of plasmid pLH1 from *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009: analysis reveals the presence of regions homologous to other native plasmids from the host strain. *Plasmid* **42**, 221–235.
- Torriani, S., Vecovo, M. and Scolari, G. (1994) An overview on *Lactobacillus helveticus*. *Ann Microbiol Enzimol* **44**, 163–191.
- Turner, S.L., Bailey, M.J., Lilley, A.K. and Thomas, C.M. (2002) Ecological and molecular maintenance strategies of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 177–185.
- Zawadzki, P., Riley, M.A. and Chan, F.M. (1996) Homology among nearly all plasmids infecting three *Bacillus* species. *J Bacteriol* **178**, 191–198.

## **Bibliografia**

**Bennett D.E.** and **Cafferkey M.T.** (2003). Multilocus restriction typing: a tool for *Neisseria meningitidis* strain discrimination. *J Med Microbiol*, **52**: 781-787.

**Borgo F., Ricci G., Manachini P.L.** and **Fortina M.G.** (2007) Multilocus restriction typing: a tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin. *Int Dairy J*, **17**: 336-342.

**Coenye T.** and **LiPuma J.J.** (2002). Multilocus restriction typing: a novel tool for studying global epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis. *J Inf Dis*, **185**: 1454-1462.

**Collins M.D., Farrow J.A.E., Phillips B.A., Feresu S.** and **Jones D.** (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int J Syst Bacteriol*, **37**: 310-316.

**De Rossi E., Brighi P., Riccardi G., Milano A.** and **Matteuzzi D.** (1989). Preliminary studies on the correlation between the plasmid pLHJ1 and its proteolytic activity in *Lactobacillus helveticus* S362. Physical mapping and molecular cloning of the plasmid in *Escherichia coli*. *Microbiol*, **12**: 273.

**Dimitrov Z., Michaylova M.** and **Mincova S.** (2005). Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Bulgarian yoghurt, cheese, plants and human faecal samples by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of cell-wall proteins, ribotyping and pulsed field gel fingerprinting. *Int Dairy J*, **15**: 998-1005.

**Drake M.A., Small C.L., Spence K.D. and Swanson B.G.** (1996). Differentiation of *Lactobacillus helveticus* strains using molecular typing methods. *Food Res Int*, **29**: 451-455.

**Dykes G.A. and Von Holy A.** (1994). Strain typing in the genus *Lactobacillus*. *Lett Appl Microbiol*, **19**: 63-66.

**Flickinger J.L., Porter E.V. and Chassy B.M.** (1986). Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol, **H179**: 156.

**Fortina M.G., Parini C., Manachini P.L., Morelli L., Bottazzi V. and Concari P.** (1990). Genotypic and phenotypic correlations among some strains of *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Lett*, **12**: 765-770.

**Fortina M.G., Parini C., Rossi P. and Manachini P.L.** (1993). Mapping of three plasmids from *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Lett Appl Microbiol*, **17**: 303-306.

**Fortina M.G. and Silva M.** (1996). Mapping of two plasmids from *Lactobacillus helveticus* ILC54, plasmid curing and preliminary studies on their involvement in lactose metabolism and peptidase activity. *Biotechnol Lett*, **18**: 1003-1006.

**Fortina M.G., Nicastro G., Carminati D., Neviani E. and Manachini P.L.** (1998). *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. *J Appl Microbiol*, **84**: 72-80.

**Fortina M.G., Ricci G., Mora D., Guglielmetti S. and Manachini P.L.** (2003). Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. *Appl Environ Microbiol*, **69**: 3238-3243.

**Gatti M., Contarini G. and Neviani E.** (1999). Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *J Appl Microbiol*, **85**: 411-416.

**Giraffa G., De Vecchi P., Rossi P., Nicastro G. and Fortina M.G.** (1998). Genotypic heterogeneity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural cheese starters. *J Appl Microbiol*: **85**: 411-416.

**Giraffa G., Gatti M., Rossetti L., Senini L. and Neviani E.** (2000). Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 1259-1265.

**Hammes W.P., Weiss N. and Holzapfel W.** (1991). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The prokaryotes*. Ed. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K.H., Springer-Verlag, New York, **2**: 1535-1594.

**Hammes W.P. and Vogel R.F.** (1995). The genus *Lactobacillus*. In: *The genera of lactic acid bacteria*. Eds. Wood B.J.B, Holzapfel W.H., Chapman & Hall, London, **2**: 19-54.

**Han S.R., Zschausch H.-C.E., Meyer H.-G., Schneider T., Loos M., Bhakdi S. et al.** (2000). *Helicobacter pylori*: clonal population structure and restricted transmission within families revealed by molecular typing. *J Clin Microbiol*, **38**: 3646-3651.

**Joeger M.C. and Klaenhammer T.R.** (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol*, **167**: 439-446.

**Jones N., Bohnsack J.F., Oliver K.A., Chan M.S., Kunst F., Glaser P., Rusniok C., Crook D.W., Harding R.M., Bishart N. and Spratt B.G.** (2003). Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol*, **41**: 2530-2536.

**Kandler O. and Weiss N.** (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, **2**: 1208-1234.

**Lee L.J., Hansen J.B., Jagusztyn-Krynicka E.K. and Chassy B.M.** (1982). Cloning and expression of the  $\beta$ -D-phosphogalactoside galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei* in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **152**: 1138-1146.

**Lombardi A., Dal Maistro L., De Dea P., Gatti M., Giraffa G. and Neviani E.** (2002). A polyphasic approach to highlight genotypic and phenotypic diversities of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from dairy starter cultures and cheeses. *J Dairy Res*, **69**: 139-149.

**Morelli L., Vescovo M., Cocconcelli P.S. and Bottazzi V.** (1986). Fast and slow milk-coagulating variants of *Lactobacillus helveticus* HML1. *J Microbiol*, **32**: 758-760.

**Muller-Graf C.D.M., Whatmore A.M., King S.J., Trzcinski K., Pickerill A.P., Doherty N. et al.** (1999). Population biology of *Streptococcus pneumoniae* isolated from oropharyngeal carriage and invasive disease. *Microbiol*, **145**: 3283-3293.

**Neviani E., Gatti M., Mucchetti G. and Addeo F.** (1998). Considerazioni sul siero innesto naturale per Grana. *Latte*, **23**: 76-84.

**Orla-Jensen** (1919). The lactic acid bacteria. Hostet Son, Copenhagen.

**Pearson W.** and **Lipman D.** (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America, **85**: 2444-2448.

**Pridmore D., Stefanova T.** and **Mollet B.** (1994). Criptic plasmids from *Lactobacillus helveticus* and their evolutionary relationship. FEMS Microbiol Lett, **124**: 301-306.

**Reinheimer J.A., Morelli L., Bottazzi V.** and **Suarez V.** (1995). Phenotypic variability among cells of *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. Int Dairy J, **5**: 97-103.

**Reuter G.** (1986). Zur systematic hygienisch und technologisch wichtiger bakterien in der milchwirtschaft. Dtsch. Molkerei-Zeitung, **94**: 644-655.

**Ricci G.** and **Fortina M.G.** (2006). Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from cheeses by distribution studies of insertion sequences. Int J Food Microbiol, **112**: 112-119.

**Schlegel H.G.** (1976). Microbiologia. Eds Zanichelli, Bologna.

**Schleifer K.H.** (1986). Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, **2**: 999-1002.

**Sharpe M.E., Fryer T.F.** and **Smith D.G.**(1966). Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification methods for microbiologists, Part A. Eds. Gibbs B.M. and Skinner F.A., Academic Press, London, 65-79.

**Thompson J.K., Foley S., McConville K.J., Nicholson C., Collins M.A.** and **Pridmore D.** (1999). Complete sequence of plasmid pLH1 from *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009: analysis reveals the presence of

regions homologous to other native plasmids from the host strain. *Plasmid*, **42**: 221-235.

**Vanechoutte M., Rossau R., De Vos P., Gillis M., Janssens D., Paepe N., De Rouck A., Fiers T., Claeys G. and Kersters K.** (1992). Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett*, **93**: 227-234.

**Vaughan E.E., Daly C. and Fitzgerald G.F.** (1992). Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J Appl Bacteriol*, **73**: 229-308.

**Vogel R.F., Müller M., Stolz P. and Ehrmann M.** (1996). Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. *Adv Food Sci*, **18**: 152-159.



**5.**

**Approccio  
polifasico tassonomico  
e caratterizzazione  
della nuova specie  
*Enterococcus italicus***

## 5.1 Il genere *Enterococcus*

Gli enterococchi sono dei batteri Gram positivi, di forma coccoide, omofermentanti, catalasi negativi, anaerobi ossigeno tolleranti ed in grado di svilupparsi in un ampio range di temperatura e concentrazione salina. Possono essere ritrovati in diversi habitat, quali il suolo, il tratto intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, sui vegetali e nei prodotti caseari.

Il gruppo degli enterococchi è stato descritto per la prima volta da Thiercelin nel 1899; qualche anno dopo, nel 1903, fu lo stesso autore ma con l'ausilio di Jouhaud a proporre il genere *Enterococcus* per microrganismi diplococchi di origine intestinale Gram positivi. Quando furono descritte per la prima volta le specie *E. faecium* e *E. durans*, queste furono classificate come appartenenti al genere *Streptococcus* (Orla-Jensens, 1919).

Nel 1910 Kalina propose di trasferire [*Streptococcus*] *faecium* nel genere *Enterococcus* e di riclassificare [*Streptococcus*] *durans* in *E. faecium* subsp. *durans*. Entrambe le proposte non furono accettate sebbene molti altri autori confermarono un'elevata similarità fenotipica fra le due specie.

Solo dopo un approfondito studio sugli acidi nucleici, mediante le analisi di sequenza del gene 16s rRNA, gli streptococchi *sensu lato* vennero divisi in tre generi:

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

- *Streptococcus sensu stricto*, comprendente la maggior parte delle specie conosciute (streptococchi piogeni, orali e le specie *S. thermophilus*, *S. salivarius*, *S. bovis* e *S. uberis*);
- *Enterococcus*, comprendente gli streptococchi di origine fecale e tutte le specie di successiva descrizione ad essi correlati;
- *Lactococcus*, comprendente gli streptococchi lattici.

*S. faecalis* e *S. faecium* furono così trasferiti nel genere *Enterococcus* e rinominati, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984).

Poco dopo *Streptococcus durans* fu dichiarato come appartenente al genere *Enterococcus* e riclassificato come *E. durans*; queste conclusioni erano basate su alcune differenze fenotipiche e sulla bassa omologia DNA-DNA con *E. faecium* (Collins *et al.*, 1984). Un anno più tardi fu dimostrato che ceppi aventi caratteristiche biochimiche intermedie fra *E. faecium* e *E. durans*, costituivano una diversa e separata specie rinominata come *E. hirae* (Farrow & Collins, 1985).

Studi filogenetici più approfonditi hanno permesso di ascrivere gli enterococchi alla sottodivisione clostridiale dei batteri Gram positivi, insieme agli altri generi di batteri lattici: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. All'interno di tale suddivisione, gli enterococchi formano un distinto cluster

comprendente anche i generi *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (Devriese *et al.*, 1993; Devriese & Pot, 1995).

Nonostante le continue revisioni tassonomiche, il genere rimane un raggruppamento alquanto eterogeneo: non solo alcune specie non posseggono tutte le caratteristiche fenotipiche ritenute peculiari del genere, quali la capacità di crescere a 10 e a 45°C, a concentrazioni pari a 6,5% di NaCl e a valori di pH di 9,6. E' stato verificato che queste caratteristiche possono essere possedute anche da ceppi appartenenti a specie ascrivibili ad altri generi come *Streptococcus* e *Lactococcus*. Un esempio, *E. columbae* è caratterizzato dall'incapacità di crescere al 6,5% di NaCl (Devriese *et al.*, 1993), mentre diversi ceppi di *Lactococcus lactis* isolati da matrici casearie hanno mostrato la capacità di crescere anche a 10°C.

Attualmente sono ascritte al genere *Enterococcus* più di 20 specie che sono state suddivise in quattro "gruppi-specie" creati in funzione della similarità della sequenza del gene codificante per il 16S rRNA (Williams *et al.*, 1991; Devriese & Pot, 1995; Stiles & Holzapfel, 1997; De Vaux *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda l'identificazione a livello di specie, l'omologia di sequenza del gene 16S rRNA, nel caso degli enterococchi non è però altamente discriminante, perché sono stati riscontrati elevati valori di omologia (superiore al 97%) anche tra ceppi di specie diverse. Per questo motivo, a livello genetico, solo la determinazione della percentuale di riassociazione molecolare DNA/DNA può indicare con precisione ed esattezza la specie di appartenenza di un isolato. L'impiego ulteriore di tecniche di tipizzazione molecolare come l'analisi della regione spaziatrice

dell'operone ribosomale (RSA), l'amplificazione con primer casuali del DNA (RAPD) o l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) offrono inoltre l'opportunità di individuare anche il grado di polimorfismo genetico eventualmente presente anche all'interno di una stessa specie, che può rispecchiarsi in un polimorfismo di interesse biotecnologico.

Anche per quanto riguarda il ruolo svolto dagli enterococchi all'interno delle matrici alimentari risulta di non facile soluzione la problematica, relativa soprattutto al rischio, paventato da diversi ricercatori di una possibile loro trasmissione e colonizzazione intestinale, attraverso l'ingestione di alimenti. Se da un lato la loro presenza viene considerata come "indice di contaminazione fecale", dall'altro lato il loro intervento è richiesto, come nel caso della produzione di particolari formaggi. I batteri appartenenti al genere *Enterococcus* posseggono infatti la capacità di svilupparsi e riprodursi in una grande varietà di formaggi, ed in modo particolare, considerate le modalità di produzione, in prodotti caseari artigianali prodotti nell'Europa meridionali partendo da latte crudo o pastorizzato di vacca, capra, pecora o bufala.

In generale gli enterococchi rappresentano una porzione importante della popolazione batterica presente in alcuni formaggi stagionati. La loro dominanza e persistenza durante la stagionatura è da attribuirsi al loro ampio intervallo di temperatura di crescita, alla loro resistenza ai trattamenti termici, alla tolleranza all'acidità ed al sale; quest'ultima caratteristica determina inoltre, durante il periodo di stagionatura in cui si ha un aumento della concentrazione salina, una selezione microbica a favore di questo genere. Gli enterococchi hanno inoltre delle caratteristiche protecnologiche considerate importanti per lo sviluppo

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

dell'aroma, tanto nella fase di produzione quanto nella fase di stagionatura di alcuni formaggi. Gli aspetti benefici degli enterococchi nello sviluppo di aromi nei formaggi, hanno fatto sì che alcuni ceppi di questo genere fossero inclusi in associazione alle colture starter impiegate ad esempio nella produzione del formaggio Cebreiro spagnolo (Centeno *et al.*, 1999). Allo stesso modo è stata dimostrata l'importanza di *E. durans* nello sviluppo dell'aroma di Feta, formaggio greco (Manolopoulou *et al.*, 2003), e di *E. faecalis* nella produzione di mozzarella di bufala italiana (Villani & Coppola, 1994). Inoltre in uno studio riguardante 48 campioni di formaggi selezionati come rappresentanti di diverse tipologie di prodotti italiani freschi, morbidi, stagionati, è stata riscontrata la presenza di enterococchi nel 96% dei casi (Gatti *et al.*, 1994).

Un esempio degli enterococchi isolati in alcuni formaggi prodotti nell'Europa meridionale è riportato in tabella 1.

Formaggi	Paese d'origine	Tipo di latte	Enterococchi durante la coagulazione (log CFU/g)	Enterococchi durante la stagionatura (log CFU/g)	Enterococchi presenti
White-brined	Grecia	Latte crudo di capra Latte crudo di capra e di pecora	4,0	6,7	<i>E. faecium</i> (12%) <i>E. faecalis</i> (9%)
Kefalotyri	Grecia	Latte di pecora Latte vaccino Latte di capra e	4,9	5,8	<i>E. faecium</i> (35,6%) <i>E. durans</i> (9,2%)

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

pecora					
Teleme	Grecia	Latte di pecora pastorizzato	n.d.	n.d.	<i>Enterococcus</i> spp.
La Serena	Spagna	Latte crudo di pecora	6,2	7,2	<i>Enterococcus</i> spp.
Manchego	Spagna	Latte crudo di pecora	n.d.	n.d.	<i>Enterococcus</i> spp.
Cebreiro	Spagna	Latte crudo vaccino	n.d.	6,5	<i>E. faecalis</i> (30,1%) <i>E. faecium</i> (4,8%)
Serra cheese	Portogallo	Latte crudo di pecora	n.d.	n.d.	<i>E. faecium</i>
Picante de Breira (Baixa)	Portogallo	Latte crudo di capra e di pecora	n.d.	n.d.	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i>
Caprino semicotto	Italia	Latte crudo di capra	4,9	5,6	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i>
Pecorino sardo	Italia	Latte crudo di pecora	n.d.	n.d.	<i>Enterococcus</i> spp.

**Tabella 1. Presenza di enterococchi in formaggi europei.**

## 5.2 Gli enterococchi: benefici o dannosi?

Nel paragrafo precedente si è sottolineato il ruolo positivo dei microrganismi appartenenti al genere *Enterococcus*, nel settore lattiero-caseario ma in altri settori agro-alimentari la presenza degli enterococchi, rappresenta un fattore di contaminazione per lo più di tipo alterativo. La tecnologia di produzione della maggior parte dei prodotti a base di carne,

come i salumi, prevede un'iniziale fermentazione, ad opera anche degli enterococchi, a cui fa seguito un processo di salatura o affumicatura. In queste condizioni, gli enterococchi, che solitamente si trovano nella carne cruda in un range variabile da  $10^2$  a  $10^4$  UFC/g, e che resistono ad elevati valori di pH e di salinità, possono crescere velocemente e causare alterazioni anche molto importanti al prodotto finito. Gli enterococchi possono inoltre rappresentare un fattore di contaminazione anche in carni sottoposte a trattamento termico, soprattutto se inizialmente presenti in numero elevato, per la loro resistenza alle alte temperature. Uno studio sugli enterococchi isolati da carne cruda, ha evidenziato infatti che l'isolato più rappresentativo nella carne di manzo e di maiale è *E. faecalis*; è inoltre frequente la presenza di *E. faecium*. In un altro studio è emersa la predominanza di *E. faecalis* tra i cocchi Gram positivi isolati da carni di pollo.

Sebbene non ci siano evidenze certe che gli enterococchi contaminanti gli alimenti possano costituire la causa diretta di un processo di patogenicità, la loro presenza può rappresentare un rischio di espansione della resistenza agli antibiotici, attraverso la catena alimentare. Gli enterococchi costituiscono un importante gruppo di batteri ubiquitari, il cui habitat predominante è rappresentato dal tratto intestinale di uomini e animali. Per questa loro fonte endogena sono stati spesso associati a fenomeni di infezioni intestinali. Ma è solo negli ultimi dieci anni che questi microrganismi, considerati un tempo di minimo impatto clinico, sono sorti alla ribalta, specialmente *E. faecalis* e *E. faecium*, come patogeni emergenti in un numero sempre crescente di infezioni ad essi associate (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999). Gli enterococchi non

possiedono i tipici fattori di virulenza presenti negli altri microrganismi patogeni, ma alcune peculiari caratteristiche, tra cui un'ampia resistenza ad antibiotici e la capacità di sopravvivenza ad elevate temperature ed in condizioni avverse. Queste caratteristiche possono contribuire alla loro potenziale virulenza e a renderli patogeni opportunisti soprattutto negli ambienti ospedalieri (Jett *et al.*, 1994; Leclerc, 1997; Robredo *et al.*, 2000).

Per contro, gli enterococchi, in quanto ubiquitari, possono ritrovarsi liberi nel suolo, sui vegetali ed in grande numero sono stati ritrovati, come già riportato, in molti prodotti caseari, in alcuni dei quali rappresentano la popolazione batterica dominante (Franz *et al.*, 1999). Se per lungo tempo la presenza di enterococchi nei prodotti caseari è stata considerata come un indice di insufficienti condizioni igieniche, oggi giorno sono molti gli studiosi che sottolineano il ruolo positivo di questi batteri per la loro spiccata attività lipolitica e proteolitica, per la capacità di produrre sostanze aromatizzanti che conferiscono tipicità a particolari formaggi, e per la produzione di batteriocine, note con il termine di enterocine, attive contro batteri anticaseari e patogeni, come *Listeria monocytogenes* (Joosten *et al.*, 1996; Ennahar & Deschamps, 2000; Suzzi *et al.*, 2000).

Da quanto detto è facile chiedersi: gli enterococchi possono essere considerati microrganismi G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe)? Al momento ancora la comunità scientifica non si è pronunciata. Gli studi sono rivolti a verificare se esiste una differenza di patogenicità tra gli enterococchi ritrovati negli alimenti e quelli associati ad infezioni intestinali, anche in funzione della diversa specie di appartenenza. E' stato ad esempio riportato che ceppi di enterococchi isolati da prodotti caseari non producono emolisine, e per questo motivo è stato suggerito che tale

caratteristica potesse essere un buon criterio per selezionare le colture d'avvio per il settore caseario (Arihara *et al.*, 1993). Tuttavia è stato anche accertato che tale attività non sempre è associata agli isolati clinici (Franz *et al.*, 1999), per cui non è possibile far corrispondere alla mancata emolisi una non virulenza del ceppo. Anche per quanto riguarda la resistenza agli antibiotici, i risultati reperibili in letteratura sono a volte contrastanti, con alcuni studi che sottolineano la maggior sensibilità degli isolati da alimenti o da acque alla maggior parte degli antibiotici di interesse clinico (Batish & Ranganathan, 1986) e altri studi dimostranti non solo una uguale resistenza ma anche un possibile trasferimento orizzontale di tale capacità (Perreten *et al.*, 1997).

In questo contesto risulta essere di grande importanza sia per il microbiologo medico che alimentare avere a disposizione gli strumenti idonei per procedere ad una corretta identificazione degli isolati, prima a livello di specie, ed in secondo luogo a livello di biotipo, per poter capire in modo scientificamente valido l'implicazione, positiva o negativa, della presenza degli enterococchi in uno specifico habitat.

### 5.2.1 Fattori di virulenza e patogenicità

Per molti anni gli enterococchi sono stati considerati commensali innocui con un basso potenziale patogeno. In termini generali, ciò è vero perché essi mancano di potenti fattori di virulenza in confronto ad altri patogeni Gram-positivi come *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Tuttavia, questa visione sta cambiando a causa del ruolo crescente degli

enterococchi in infezioni nosocomiali, specialmente in condizioni di pressioni selettive generate da antibiotici.

Tra i fattori di virulenza correlabili alla patogenicità sono da considerare la capacità di colonizzazione e adesione, di resistenza ai meccanismi di difesa specifici e aspecifici dell'ospite e l'abilità di indurre nel tessuto colpito danni patologici, come conseguenza della produzione di feromoni e citolisine (Johnson, 1994; Franz *et al.*, 1999). A questo bisogna aggiungere la resistenza agli antibiotici e la possibilità di trasferimento di tale attitudine ad altri batteri, in quanto i corrispondenti determinanti genici, negli enterococchi, sembrano essere portati a livello plasmidico (Simjee & Gill, 1997).

- **Colonizzazione ed adesione al tessuto ospite:** è accertato che gli enterococchi sono in grado di colonizzare il tratto gastro-intestinale, poiché normali abitanti dell'intestino umano e le loro infezioni si originano dal tratto gastro-intestinale e da quello genito-urinario. Esistono evidenze sulla diffusione da paziente a paziente e sull'esistenza di portatori sani, che espellono tali microrganismi attraverso le feci. Tale caratteristica di per sé non costituisce un fattore di virulenza, ma può amplificare la potenziale patogenicità di un ceppo, in combinazione con altri fattori di virulenza (Franz *et al.*, 1999). La capacità di aderire ai differenti tessuti, che si esplica attraverso varie interazioni di natura idrofobica e la produzione di specifiche adesine, è considerata di grande importanza per iniziare un processo di infezione. La sostanza di aggregazione AS (Aggregation Substance)

è la più studiata tra le adesine degli enterococchi: questa è una proteina di superficie, feromone inducibile, che media il legame fra la cellula donatrice e quella ricevente. In questo contesto, è riportato che sia *E. faecium* che *E. faecalis* sono in grado di legarsi a specifiche proteine esocellulari tissutali, come trombospondina e lattoferrina, anche se non sono stati identificati i componenti batterici superficiali responsabili di questi legami (Zareba *et al.*, 1997). Ceppi di *E. faecalis* hanno anche mostrato, in vitro, la capacità di aderire alle cellule epiteliali del tratto urinario e alla cellule cardiache. Tale adesione sembra essere mediata da adesine di superficie contenenti residui di D-glucosio e D-mannosio (Guzman *et al.*, 1991). Gli enterococchi possiedono una proteina di parete extracellulare ad alto peso molecolare chiamata Esp, con funzioni sconosciute, per la quale sono stati rilevate alte frequenze di ritrovamento tra gli isolati derivanti da infezioni nosocomiali (Shankar *et al.*, 1999). Questa proteina contribuisce alla colonizzazione e persistenza degli enterococchi nel tratto urinario ed inoltre favorisce la formazione di biofilm su superfici biotiche e abiotiche (Shankar *et al.*, 2001; Toledo-Arana *et al.*, 2001). Inoltre *E. faecalis* ed *E. faecium* sono caratterizzati da due ulteriori adesine specifiche chiamate rispettivamente Efa Afs ed Efa Afm (Lowe *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1998).

- **Danni patologici:** metaboliti batterici come feromoni sessuali e specifiche proteine batteriche sembrano essere i composti responsabili di processi infiammatori acuti associati alla presenza

di enterococchi (Johnson, 1994). Tali composti sembrano indurre ad esempio nei leucociti una secrezione di enzimi lisosomiali (Johnson, 1994). Alcuni ceppi patogeni di enterococchi, producono citolisine che inducono dei danni tissutali; anche la produzione di emolisina e gelatinasi, rispettivamente in grado di idrolizzare l'emoglobina e altri peptidi bioattivi, rappresentano fattori di virulenza importanti, soprattutto se tali proprietà virulente sono presenti contemporaneamente in uno stesso ceppo (Coque *et al.*, 1995).

- **Resistenza agli antibiotici:** la virulenza degli enterococchi può essere fortemente influenzata dalla loro frequente resistenza nei confronti dei comuni antibiotici attualmente utilizzati. Tale resistenza, sia intrinseca che acquisita, può rendere gli enterococchi degli effettivi patogeni opportunisti negli ambienti ospedalieri. L'antibiotico-resistenza e le infezioni nosocomiali sono fenomeni che si rinforzano mutuamente perché la resistenza permette agli enterococchi di sopravvivere in ambiente ospedaliero in cui sono utilizzati antibiotici e gli ospedali forniscono opportunità per la diffusione di organismi resistenti (Franz *et al.*, 1999). Gli enterococchi mostrano una resistenza intrinseca alle cefalosporine e ai  $\beta$ -lattami (Leclercq, 1997), rendendo difficoltosa la cura di un processo infettivo con tali antibiotici. Oltre a queste resistenze costitutive, alcuni enterococchi hanno acquisito i determinanti genici che conferiscono resistenza a tutte le classi di sostanze ad attività

antibatterica, come cloramfenicolo, tetraciclina e glicopeptidi. Il maggior rischio legato alla resistenza a questi ultimi antibiotici è che le relative informazioni genetiche possono essere facilmente trasferite, mediante processi mediati da feromoni, plasmidi coniugativi o trasposoni, dai ceppi di enterococchi a ceppi di patogeni più virulenti, quali *Staphylococcus aureus* (Clewell, 1990; Simjee & Gill, 1997). L'origine dei geni coinvolti nei meccanismi di antibiotico-resistenza nei batteri patogeni non è chiaro. Il periodo che intercorre tra l'inizio dei trattamenti antibiotici (50-60 anni fa) e la comparsa di batteri in grado di esprimere efficienti meccanismi di resistenza è troppo breve per spiegare lo sviluppo di fattori di resistenza da altre proteine attraverso mutazioni spontanee. In particolare, se un meccanismo di resistenza richiede l'azione congiunta di diverse proteine (per esempio la resistenza alla vancomicina) è improbabile la generazione *de novo* di tali meccanismi di resistenza nel patogeno. I geni di resistenza si sono probabilmente sviluppati nei microrganismi produttori di antibiotici come parte del corredo genetico biosintetico per la cellula dall'azione dannosa del proprio antibiotico. Successivi eventi di trasferimento genico possono aver diffuso i determinanti la resistenza ad altri batteri (Grohmann *et al.*, 2003). Nei batteri, il trasferimento orizzontale di geni è ampiamente riconosciuto come il meccanismo responsabile della diffusione dei determinanti genici correlati all'antibiotico-resistenza (De la Cruz & Davies, 2000). Esso è definito come il trasferimento di geni tra specie differenti, o attraverso ampie categorie tassonomiche. Al

contrario, il trasferimento verticale avviene quando un organismo riceve materiale genetico da una specie dalla quale si è evoluto o da un microrganismo suo progenitore. I meccanismi coinvolti nel trasferimento orizzontale di geni, che possono essere mediati da batteriofagi, plasmidi, trasposoni, sono denominati: coniugazione, processo nel quale una cellula batterica trasferisce materiale genetico attraverso il contatto diretto cellula-cellula, che porta alla formazione di un ponte citoplasmatico e al trasferimento del genoma intero o parziale del donatore al recipiente; trasduzione, processo nel quale DNA batterico è trasferito da un batterio da un altro attraverso un virus batterico (un batteriofago) e trasformazione, acquisizione di DNA esterno da parte di una cellula senza contatto diretto.

- **Produzione di ammine biogene:** le cariche elevate raggiunte dagli enterococchi in molti alimenti possono portare alla formazione di livelli significativi di ammine biogene (Garg & Mital, 1991; Giraffa, 1995). Questi composti vengono prodotti a partire da amminoacidi liberi ad opera dell'attività decarbossilasica del microrganismo. Non è chiaro quali fattori portino alla formazione di elevate quantità di ammine biogene nel formaggio: sembrano esserci molteplici fattori ambientali che possono influenzare la produzione di ammine da parte degli enterococchi, fra cui la temperatura, il pH e la concentrazione di sale (Gardini *et al.*, 2001). Il livello tossicologico delle ammine è molto difficile da stabilire in quanto dipende dalle caratteristiche individuali, come

la salute e la sensibilità individuale, e dalla presenza di altre ammine. Grandi quantità di tiramina e istamina possono provocare sintomi di ipertensione, ipotensione, mal di testa, orticaria, nausea e vomito (Edwards & Sandine, 1981); putrescina e cadaverina possono inoltre reagire con il nitrito e formare nitrosammine cancerogene. Per quanto riguarda gli enterococchi, le uniche attività decarbossilasiche rilevate in prodotti lattiero-caseari riguardano la produzione di tirosina, feniletilenammina e tiramina (Gardini *et al.*, 2001); è stata invece dimostrata l'incapacità da parte di questi microrganismi di produrre istamina in latte.

### 5.2.2 Attività protecnologica e biotecnologica

In generale, specifiche tipologie di microrganismi vengono monitorate per accertare la qualità microbiologica di un alimento. Controllando la presenza ed il numero dei cosiddetti organismi indicatori in specifici alimenti durante il processo, si può determinare infatti se sono state correttamente applicate le GMPs (Good Manufacturing Practices, buone pratiche di lavorazione).

Gli enterococchi, per loro natura ubiquitari, possono essere isolati da habitat molto differenti fra loro, e si possono ritrovare nei prodotti alimentari, sia in seguito ad una loro presenza nelle materie prime (soprattutto carne e latte) e successiva moltiplicazione durante i processi fermentativi, sia in seguito ad una contaminazione del prodotto finito. In

questi casi la loro presenza non sempre è indice di scarse condizioni igieniche durante il processo produttivo, ma soprattutto nel comparto lattiero-caseario, la loro presenza risulta indispensabile per ottenere formaggi di qualità.

Alcune specie di enterococchi in particolare, possiedono alcune proprietà biotecnologiche utili e desiderabili.

- **Attività biochimiche:** molti isolati mostrano elevata attività proteolitica nei confronti della caseina, ed una buona attività esterasica nei confronti dei lipidi presenti nel latte. Inoltre, attraverso il loro metabolismo fermentativo sono in grado di produrre tipici composti aromatizzanti come acetaldeide, acetoino e diacetile (Franz *et al.*, 1999).
- **Produzione di batteriocine:** studi condotti sugli enterococchi isolati da prodotti alimentari hanno evidenziato come numerosi ceppi appartenenti a varie specie, tra cui anche *E. faecalis* e *E. faecium* producono enteriocine. Alcune di queste sono state ben caratterizzate (Joosten *et al.*, 1996; Ennahar & Deschamps, 2000): esse risultano particolarmente interessanti poiché esplicano un spiccata attività antimicrobica nei confronti di *Listeria monocytogenes* ed alcune sono risultate anche attive contro *Clostridium* spp. (tra cui *C. botulinum*, *C. perfringens* e *C. tyrobutirricum*) (Torri Tarelli *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 1999).
- **Attività probiotica:** la maggior parte dei microrganismi definiti come probiotici sono di origine intestinale ed appartengono ai generi *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Ceppi di altri generi

vengono ugualmente utilizzati e tra questi ritroviamo, non con poca sorpresa, per quanto prima riportato, *E. faecium* e *E. faecalis* anche se quest'ultimo è maggiormente utilizzato nelle produzioni destinate agli animali. La possibilità di utilizzo di un ceppo specifico di *E. faecium* come probiotico, specialmente nei casi di dissenteria, è stata a lungo studiata. La sua efficacia contro i disordini intestinali è stata attribuita al suo breve periodo di riproduzione (circa 20 minuti per ogni generazione in condizioni ottimali), alla sua moderata resistenza ad antibiotici ed al suo effetto inibente contro *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ed *Enterobacter* spp.

### **5.3 La nuova specie *Enterococcus italicus***

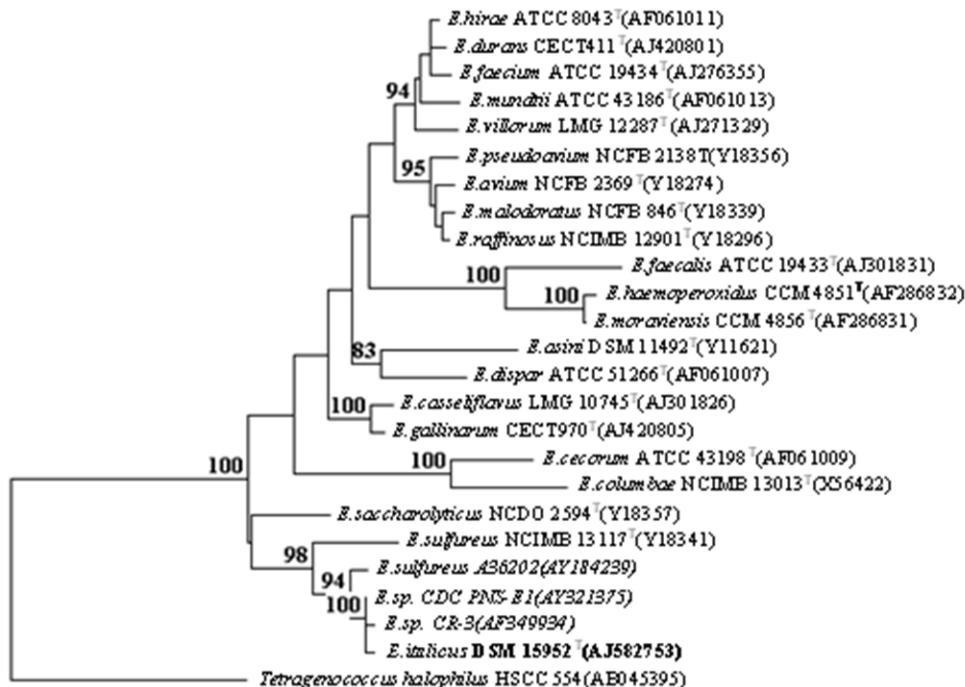
Nell'ambito di un Progetto Nazionale, volto alla caratterizzazione e salvaguardia delle popolazioni microbiche coinvolte nelle produzioni casearie italiane, sono stati isolati ed identificati 116 batteri lattici di forma coccoide, provenienti da campioni di Toma piemontese, della quale non era nota la componente microbica responsabile della sua tipicità. I risultati ottenuti da questa precedente ricerca hanno permesso di evidenziare come, tra i batteri lattici di forma coccoide, che rappresentano la componente lattica dominante (il 92% degli isolati totali), i lattococchi siano il principale gruppo rappresentato. Essi costituiscono il 66% degli isolati, di cui il 43% è ascrivibile alla specie *Lactococcus lactis* ed il rimanente 57% alla specie *Lactococcus garvieae*. Come componenti minori della complessa popolazione lattica del formaggio Toma sono risultati

## 5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

ceppi appartenenti al genere *Enterococcus*, rappresentanti il 16% degli isolati totali a forma coccoide. Questi ultimi sono stati isolati principalmente da campioni di formaggio a 30 giorni di stagionatura e sono risultati ascrivibili principalmente alla specie *Enterococcus faecium*, a cui fa seguito *Enterococcus durans* e *Enterococcus faecalis* (Fortina *et al.*, 2003). Cinque isolati di enterococchi erano risultati atipici e non ascrivibili a nessuna specie tra quelle note nell'ambito del genere *Enterococcus*.

Per questo motivo si è proceduto con un approccio polifasico al fine di valutarne le principali proprietà fenotipiche, biotecnologiche, genetiche e filogenetiche per ottenerne una corretta posizione tassonomica ed un'approfondita biotipizzazione. Sono stati inoltre coinvolti in questo studio due ceppi riconducibili ai precedenti, isolati da Robiola, un altro formaggio artigianale piemontese. L'analisi complessiva dei dati tassonomici ottenuti ha consentito di evidenziare come i ceppi allo studio siano i rappresentanti di una nuova specie nell'ambito del genere *Enterococcus*, per la quale è stata proposta la denominazione *Enterococcus italicus* (Fortina *et al.*, 2004).

I ceppi di nuovo isolamento risultano facilmente distinguibili dai ceppi di riferimento dei vari sottogruppi filogenetici nei quali solitamente gli enterococchi vengono suddivisi, per i bassi valori riscontrati di omologia di sequenza del gene codificante per l'rRNA 16S e di omologia genetica DNA/DNA. Per quanto riguarda gli studi filogenetici, sono stati ottenuti valori di omologia uguali o minori del 96%. Nell'ambito di questo gruppo di microbico, le correlazioni filogenetiche possono essere molto strette anche tra specie diverse e il valore soglia del 97% ritenuto valido per molti gruppi



batterici, nel caso degli enterococchi non sempre è sufficiente per avere una discriminazione a livello di specie.

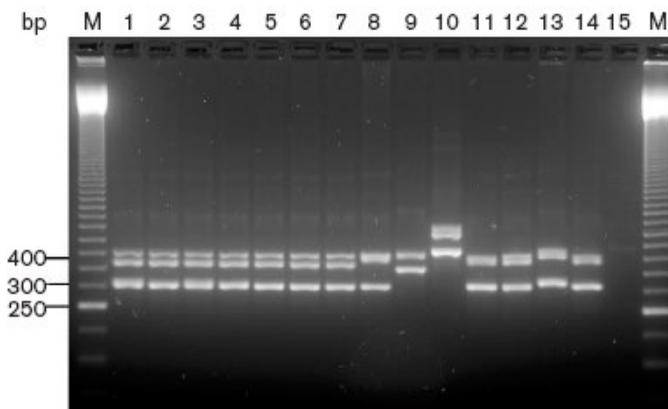
Le specie con le quali i ceppi allo studio risultano essere filogeneticamente più correlati sono *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus sulfureus* con una percentuale di omologia del 96% ed *Enterococcus gallinarum* (95%) (Fig.1).

Figura 1. Albero filogenetico, costruito sulle sequenze del gene 16S rDNA depositate in banca dati EMBL, mostra le relazioni fra *Enterococcus italicus* sp. nov e gli altri enterococchi. La sequenza del gene 16S rDNA di *Tetragenococcus halophilus* è stata utilizzata come outgroup. Le sequenze sono state allineate utilizzando il Ribosomal Database Project service.

Per avvalorare e confermare i risultati discriminanti ottenuti nelle analisi precedenti i ceppi in esame sono stati sottoposti ad esperimenti incrociati di ibridazione molecolare DNA/DNA, mostrando valori di riassociazione molto bassi (dal 13 al 31%) con le suddette specie filogeneticamente più correlate.

I ceppi appartenenti alla nuova specie mostrano inoltre un peculiare profilo elettroforetico, dopo amplificazione specifica della regione spaziatrice dell'operone ribosomale (analisi RSA), che è risultato discriminante nei confronti delle altre specie di enterococchi presi come riferimento. E' noto, infatti, nell'ambito degli enterococchi, e soprattutto per gli enterococchi di origine fecale, che questa tecnica molecolare di recente acquisizione consente, almeno in una fase preliminare, di caratterizzare un elevato numero di isolati e di effettuare dei raggruppamenti in cluster omogenei, in funzione dei profili elettroforetici ottenuti. Se gli enterococchi in generale ben si differenziano dagli altri batteri lattici caseari (come lattococchi e streptococchi) per la presenza di due bande di amplificazione dell'operone ribosomale, questa nuova specie si caratterizza ulteriormente per la presenza di tre bande con un peso molecolare approssimativamente corrispondente a 400, 380 e 300 bp (Fig. 2).

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*



**Figura 2.** Profili elettroforetici RSA ottenuti per i ceppi di *Enterococcus italicus* e altre specie appartenenti al genere *Enterococcus*. Lanes: 1-7, ceppi di *Enterococcus italicus*; 8, *Enterococcus faecalis* NCDO 588; 9, *Enterococcus durans* NCDO 595; 10, *Enterococcus faecium* ATCC 19434T; 11, *Enterococcus sulfureus* DSM 6905T; 12, *Enterococcus gallinarum* DSM 20628T; 13, *Enterococcus avium* DSM 20679T; 14, *Enterococcus saccharolyticus* DSM 20726T; 15, controllo negativo; M, 50-base-pair ladder (Amersham Pharmacia Biotech).

A livello fenotipico, si è osservato che i nuovi isolati sono anaerobi facoltativi, immobili, non sporigeni, catalasi negativi, non pigmentati, che si raggruppano in coppie o in corte catenelle, omofermentanti, produttori di acido lattico e non di gas. I ceppi risultano in grado di crescere in un range di temperatura compreso tra 10 e 42°C, con un optimum a 37°C; alcuni ceppi sono in grado di crescere a 45°C. Sono inoltre in grado di svilupparsi a pH 9,6 ed in presenza di NaCl fino al 5%. La nuova specie può essere distinta anche fenotipicamente dalle altre specie descritte di enterococchi per la sua capacità di utilizzare, come unica fonte di carbonio, il sorbitolo.

#### **5.4 Progettazione di una sonda specie-specifica per *Enterococcus italicus***

Per quanto detto fin'ora circa l'accesso dibattito in campo scientifico a proposito della dubbia natura degli enterococchi si è inteso studiare la possibilità di ottenere, anche per *Enterococcus italicus*, una sonda specie-specifica in grado di evidenziare e monitorare con rapidità e sicurezza i ceppi ad essa ascrivibili, presenti nelle diverse matrici alimentari.

Poiché per questa specie non si hanno al momento dati relativi a sequenza geniche note, l'attenzione si è focalizzata sullo studio del gene 16S rDNA per il quale la sequenza nucleotidica è stata determinata nei nostri laboratori in studi precedenti (Fortina *et al.*, 2004) e depositata in banca dati (Gene Bank/EMBL; Accession Number: AJ582753).

L'ideazione di una sonda specie-specifica ha previsto una prima fase di ricerca in banca dati delle sequenze nucleotidiche del gene in esame disponibili per tutte le specie appartenenti al genere *Enterococcus* e una successiva fase di allineamento, in comparazione con la sequenza completa del gene codificante il 16S DNA di *E. italicus*.

Scopo è stata l'individuazione di regioni nucleotidiche in *E. italicus* sufficientemente differenti da quelle di altre specie, per poter ideare una coppia di primer che permettesse l'amplificazione specifica solo della nuova specie in esame.

L'allineamento multiplo di sequenza ha permesso di individuare due regioni geniche, all'interno del gene codificante il 16S rDNA di *E. italicus*, denominate V2 e V3 in accordo con la numerazione dello stesso gene di *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981). All'interno di queste regioni sono

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

state scelte due sequenze oligonucleotidiche utilizzabili come primer specifici.

La verifica dell' idoneità dei primer è stata dapprima effettuata in linea teorica, mediante l'ausilio del programma Blast Tool sul sito del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Poiché non sono state trovate complementarità tra le sequenze dei primer ideati e le sequenze geniche di altre specie batteriche, si è proceduto ad una verifica pratica, effettuando esperimenti di amplificazione specifica ed impiegando come confronto sia le specie di *Enterococcus* più correlate filogeneticamente a *E. italicus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. avium*, *E. saccharominimus*) sia altri generi di batteri lattici (Tab. 1).

Specie	Provenienza
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842 <sup>T</sup>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15009 <sup>T</sup>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	DSM 5622 <sup>T</sup>
<i>Lactococcus garvieae</i>	DSM 20684 <sup>T</sup>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	DSM 20481 <sup>T</sup>
<i>Leuconostoc lactis</i>	DISTAM-MI

**Tabella 1. Ceppi di batteri lattici impiegati come controllo per la costruzione della sonda specie-specifica per *E. italicus***

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

I primer impiegati sono risultati specifici per la specie *E. italicus* ed hanno permesso l'amplificazione di una regione interna al 16S rDNA del peso di circa 323 bp.

L'identificazione degli enterococchi è sempre stata problematica: numerosi batteri appartenenti a questo genere spesso rimangono non identificati, soprattutto se la loro identificazione a livello di specie è basata solo su caratteristiche fenotipiche. E' infatti molto difficile caratterizzare inequivocabilmente gli isolati e determinare la specie di appartenenza per mezzo di prove fisiologiche, poiché l'eterogeneità delle caratteristiche fenotipiche è molto elevata, indipendentemente dall'origine dell'isolato.

Risultano quindi di maggior utilità l'utilizzo di tecniche molecolari e fra queste le sonde molecolari richiedono un minor tempo e un minor costo.

I risultati ottenuti con questa ricerca e pubblicati su *Letters in Applied Microbiology*, mostrano come l'utilizzo della sonda specie-specifica per *E. italicus* sia in grado di monitorare e di evidenziare con rapidità e sicurezza i ceppi ad essa scrivibili, presenti nelle diverse matrici alimentari.

## ORIGINAL ARTICLE

**Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene**

M.G. Fortina, G. Ricci, F. Borgo and P.L. Manachini

Industrial Microbiology Section, Department of Food Science and Microbiology, University of Milan, Milan, Italy

**Keywords***Enterococcus italicus*, PCR, species-specific identification.**Correspondence**

Maria Grazia Fortina, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Sezione di Microbiologia Industriale, Università degli Studi di Milano Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy. E-mail: grazia.fortina@unimi.it

2006/0094: received 24 January 2006, revised 17 October 2006 and accepted 20 October 2006

doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02082.x

**Abstract****Aims:** To develop a species-specific PCR assay with primers targeted to 16S rRNA gene for the identification of *Enterococcus italicus*, a new species of *Enterococcus*, involved in the production of Italian cheeses.**Methods and Results:** The type strain of *E. italicus* (DSM 15952<sup>T</sup> – 16S rRNA gene accession no. AJ582753) and other strains of the species were subjected to a rapid identification by PCR using primer pairs located within the 16S rRNA gene. A species-specific PCR product of approximately 323 bp was obtained after amplification of all *E. italicus* strains tested. The specificity of the primers was validated with representatives of the most closely related genera and species and a number of other bacterial species. In addition, the technique enabled the recognition of *E. italicus* from cheeses.**Conclusions:** The protocol was highly efficient and sensitive, enabling the identification of *E. italicus* from cheeses.**Significance and Impact of the Study:** The species-specific PCR offers a reliable and rapid alternative to conventional phenotypic methods for the identification of *E. italicus* within the heterogeneous genus *Enterococcus*.**Introduction**

During a study on the natural bacterial population used in the production of artisanal Italian cheeses (Fortina *et al.* 2003), some atypical *Enterococcus* strains have been isolated. A further polyphasic study demonstrated that the strains represented a new species, for which the name *Enterococcus italicus* has been proposed (type strain DSM 15952<sup>T</sup> – 16S rRNA gene accession no. AJ582753) (Fortina *et al.* 2004). The 100% 16S rRNA gene sequence similarity found with a later described species, *Enterococcus saccharominimus* LMG 21727<sup>T</sup>, isolated from Belgian cheese (Vancanneyt *et al.* 2004), suggested that the species also occurred in other dairy products. The reclassification of *E. saccharominimus* as synonymous species of *E. italicus* was carried out by Naser *et al.* (2006). Furthermore, the high phylogenetic similarity found between *E. italicus* and the other two unidentified strains (accession nos AB349934 and AY321375) showed that this new species could be detected in other sources, as human clinical specimens. Enterococci are considered to play an essential

role in ripening and aroma development in a variety of artisanal cheeses, and therefore, are proposed as components of starter cultures (Franz *et al.* 1999). On the other hand, in the last decade, there has been a strong increase in the number of nosocomial infections caused by enterococci, related to the increasing degree of antibiotic resistance that enterococci possess. As antibiotic resistant strains of *Enterococcus* have been isolated from raw foods (Giraffi 2002), and some believe that water and foods are possible vectors of strain transmission to human intestinal microflora (Witte 2000), the control of enterococci in foods has assumed a new level of importance in food processing and food microbiology. As the genus *Enterococcus* is not a phylogenetically and phenotypically coherent and homogeneous genus, automated systems, principally based on phenotypic characteristics, not always permit the correct identification of more rarely encountered *Enterococcus* species (Devriese *et al.* 1993; Tsakris *et al.* 1998). Therefore, the possibility to carry out molecular biology-based techniques to replace classical identification methods is of great importance

5. Approccio polifascico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

Rapid identification of *E. italicus*

M.G. Fortina et al.

(Ozawa et al. 2000; Knijff et al. 2001; Naser et al. 2005). In this paper, a PCR method for detecting *E. italicus* is described, based on the primers designed on the 16S rRNA gene.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains examined in this study, which were obtained from various strain collections, were: *E. italicus* DSM 15952<sup>T</sup>, TP13, TP2.3, TP1.D (isolated from Toma piemontese cheese), RP1, RP4 (isolated from Robiola piemontese cheese), *Enterococcus avium* DSM 20679<sup>T</sup>, *Enterococcus gallinarum* DSM 20628<sup>T</sup>, *Enterococcus faecalis* ATCC 19443<sup>T</sup>, *Enterococcus faecium* ATCC 19434<sup>T</sup>, *Enterococcus saccharolyticus* DSM 20726<sup>T</sup>, *E. saccharominimus* BCCM-LMG 21727<sup>T</sup>, *Enterococcus sulfureus* DSM 6905<sup>T</sup>, *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842<sup>T</sup>, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009<sup>T</sup>, *Lactobacillus paracasei* DSM 5622<sup>T</sup>, *Lactococcus garvieae* DSM 20684<sup>T</sup>, *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* DSM 20481<sup>T</sup>, *Leuconostoc lactis* (our collection), *Streptococcus thermophilus* DSM 20617<sup>T</sup>, *Pseudomonas fluorescens* (our collection) and *Bacillus thuringiensis* (our collection) (ATCC: American Type Culture Collection, USA; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen,

Germany; BCCM-LMG: Belgian Co-ordinated Collection of Microorganisms-Bacterial Collection, Gent, Belgium). All lactic acid bacteria used throughout the whole research were grown in de Man Rogosa Sharpe (MRS) or M17 (Difco) agar or broth, at their optimum temperature. *Pseudomonas fluorescens* and *B. thuringiensis* were cultivated in nutrient broth (Difco) at 30°C.

DNA extraction

The total chromosomal DNA from overnight broth cultures of the different strains was extracted according to Fortina et al. (2003). To verify whether the quality of the extracted DNA was PCR grade, a PCR amplification of 16S rRNA gene from all the bacterial strains, using the primers described by Lane (1991), was carried out.

Primer design and PCR conditions

Oligonucleotides were selected after alignment of the enterococcal 16S rRNA gene sequences, retrieved from GenBank/EMBL, and comparison using DNAsis Max (Hitachi Software Engineering) (Table 1). The designed primers, ItaF and ItaR (Table 2), were synthesized by PRIMM (Milan, Italy). Before use, the sequence of the forward primer was checked with the BLAST tool

Table 1 Multiple alignment of V2 and V3 regions of the 16S rRNA gene sequences from 21 enterococcal species as used for the design of the specific primers ItaF, ItaR, according to *Escherichia coli* numbering of 16S rRNA gene (Brosius et al. 1981)

Species	Accession no.	V2 region		V3 region	
		190	220	491	520
<i>E. italicus</i>	AJ582753	TACCGCATAAAT	ACTTTTPTCTC	TCNREGAGTGA	AAGAGANFGT
<i>E. saccharominimus</i>	AJ626904	.....	.....	.....	TCATCCCTPG
<i>E. sulfureus</i>	Y18341	.....	T.AG...AC.G...	.GTA...	.GT.A.....
<i>E. saccharolyticus</i>	Y18357	.....	.....	G.....A.....	.....
<i>E. flavescens</i>	AJ420802	.....	T....C...A...TC.G...	.GAA...	.GT.A.....
<i>E. casseliflavus</i>	Y18161	.....	T....C...A...TC.G...	.GAA...	.GT.A.....
<i>E. gallinarum</i>	Y18160	.....	T....C...A...TC.G...	.GAA...	.GT.A.A.....
<i>E. inusitatus</i>	AM050564	.....	CT....CTC.G.C.	GAGAG	.GT.A..A.....
<i>E. aquamervinus</i>	AJ877015	.....	CT....CTC.G.C.	GAGAT	.GT.A..A.....
<i>E. raffinosus</i>	Y18296	.....	T....C..ATAGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.....
<i>E. pseudocavium</i>	Y18356	.....	T....C..AG.AAAAC.G...	.GT.TT	.GT.A.....
<i>E. avium</i>	Y18274	.....	T....C..A..CGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.....
<i>E. denressei</i>	AJ891167	.....	T....C..AG.AAAAC.G...	.GT.TT	.GT.A.....
<i>E. malodoratus</i>	Y18339	.....	T....C..G..AGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.A..A.....
<i>E. canintestini</i>	AJ888906	.....	.....	C.A.AG.AAA.A...	.TT.AT
<i>E. vilorum</i>	AJ271329	.....	T....	A..AAAAC.G...	.GT.TT
<i>E. durans</i>	AJ276354	.....	T....C..A..CGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.-.C.....
<i>E. hiae</i>	AJ420799	.....	T....C..A..CGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.-.C.....
<i>E. faecium</i>	AY675247	.....	T....C..A..CGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.-.C.....
<i>E. faecalis</i>	DQ239694	.....	.....	C..G...A.GC.G...	.GCAT
<i>E. hermanniensis</i>	AY396047	.....	.....	C..AAGAAAC.G...	.GT.TT
<i>E. mundtii</i>	Y18340	.....	T....C..A..CGAAAC.G...	.GT.TC	.GT.-.C.....

All *E.* in the first column refer to the genus *Enterococcus*.

## 5. Approccio polifaseico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus*

M.G. Fortina et al.

Rapid identification of *E. italicus*

**Table 2** Primers used in the identification PCR assays for *Enterococcus italicus*

Label	Sequence (5' to 3')	Corresponding <i>Escherichia coli</i> position	Target species
ItaF	TACCGCATAATACITTTTCT	190-211	<i>E. italicus</i>
ItaR	GTC AAGGATGAACATTCT	492-512	<i>E. italicus</i>

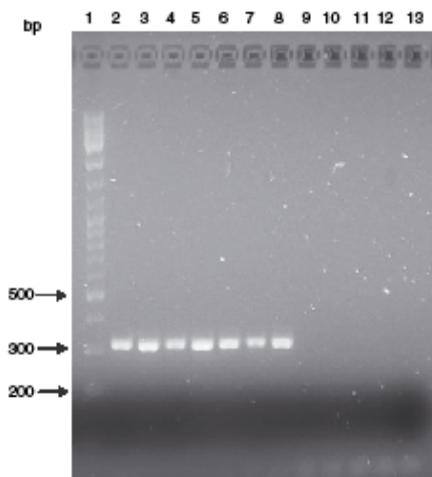
(Altschul et al. 1990), at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to ensure that no matches with other genes were present. PCR were performed in a 25- $\mu$ l reaction mixture, containing 100-ng bacterial DNA, 2.5- $\mu$ l 10 $\times$  reaction buffer (MBI-Fermentas, Vilnius, Lithuania), 200  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> of each dNTP, 2.5-mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> of each primer, and 0.5-U Taq polymerase (MBI-Fermentas). Amplification was carried out using a Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), programmed as follows: an initial denaturation step of 94°C for 2 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 45 s, followed by a final extension at 72°C for 7 min. The amplification products were separated on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide in 1 $\times$  TAE (40 mmol l<sup>-1</sup> Tris-acetate, 1-mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.2) buffer and photographed.

### Detection of *Enterococcus italicus* in cultures isolated from cheeses

Toma and Robiola piemontese cheese samples were homogenized and diluted with sterile 0.9% (w/v) saline. Then, 1 ml of suspension was plated onto M17 agar and cultured for 24 h at 37°C. After incubation, randomly selected colonies were examined by the extraction and amplification procedures outlined earlier. Selected biochemical tests on positive isolates were carried out according to Fortina et al. (2004).

### Results

PCR assays were devised to specifically identify *E. italicus* from other enterococcal species. In this context, we checked the presence of a 16S rRNA gene sequence divergence among *Enterococcus* species. The alignment of the 16S rRNA gene sequences of 21 *Enterococcus* species revealed in *E. italicus* and in *E. saccharominimus* some regions, in particular, variable V2 and V3 regions, which showed a substantial variation (Table 1). Primers were constructed using these variable regions. As shown in Fig. 1, PCR analysis performed with primers ItaF-ItaR and with DNA from *E. italicus* type strain as template, resulted in the amplification of a specific product with the expected size of 323 bp in all *E. italicus* strains and in



**Figure 1** PCR products obtained after amplification of bacterial DNA with primers specific for *Enterococcus italicus*. Strains shown as example are: *E. italicus* DSM 15952<sup>T</sup> (lane 2); *E. italicus* strains TP1.3, TP2.3, TP1.D, RP1, RP4 (lanes 3-7); *Enterococcus saccharominimus* BCCM-LMG 21727<sup>T</sup> (lane 8); *Enterococcus faecalis* ATCC 19443<sup>T</sup> (lane 9); *Enterococcus faecium* ATCC 19434<sup>T</sup> (lane 10); *Enterococcus saccharolyticus* DSM 20726<sup>T</sup> (lane 11); *Enterococcus sulfureus* DSM 6905<sup>T</sup> (lane 12); *Enterococcus avium* DSM 20679<sup>T</sup> (lane 13). Lane 1: molecular size DNA marker (MBI Fermentas).

the synonymous species *E. saccharominimus*. The presence of a fragment of approximately 1500 bp, which was obtained after PCR of all the tested strains in separate experiments, was consistent with the amplification of the 16S rRNA gene. However, no amplification products were observed, with primers ItaF-ItaR, when DNA from the type strains of six other related *Enterococcus* species was used, nor with the DNA of bacteria other than *Enterococcus* spp. This indicates the discriminating power of the 16S rRNA gene PCR described here.

Moreover, the PCR detected the bacterial isolates from Italian cheese samples. The PCR amplification targeting the 16S rDNA gene of *E. italicus* showed an amplification of 323 bp fragments in 12 of the 60 isolates selected. All these isolates were gram-positive, spherical cells which were negative for growth in 6.5% NaCl, and for acid production from L-arabinose, melzitose, melibiose, raffinose and ribose.

### Discussion

In previous investigations, the identification of *E. italicus* and its differentiation from closely related species

have been assessed using carbohydrate fermentation capacities and DNA-DNA hybridization experiments. However, these methods demand the use of time-consuming and labour-intensive procedures. For these reasons, we developed an assay based on 16S rRNA targeted PCR, which permits a rapid and unambiguous identification and differentiation of *E. italicus* strains. A 323-bp fragment within the 16S rRNA gene was amplified from all the *E. italicus* strains. The specificity of the primers selected was also verified: no amplification of the 323-bp fragment specific for *E. italicus* was observed for any of the other lactic acid bacteria species tested. This agreed with the fact that the primer set was selected within the two regions that showed the lower homology to the other GenBank sequences. As the absence of PCR product could have been caused by the lack of specific template, to make sure that all samples tested contained DNA, a preliminary PCR amplification of the 16S rRNA gene was carried out.

In conclusion, the assay described here allowed the correct identification of *E. italicus*, combining the advantages of speed, reliability and specificity. Furthermore, with this assay, we extended the range of enterococcal species, which can be reliably identified by PCR.

### Acknowledgements

This study was performed within a research project set-up and supported by the Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (MIPAF, Rome, Italy) (Paper no. 30).

### References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. and Noller, H. F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**, 107-127.
- Devriese, L.A., Pot, B. and Collins, M.D. (1993) Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* **75**, 399-408.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D. and Manachini, P.L. (2004) Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1717-1721.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. and Manachini, P.L. (2003) Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol* **20**, 397-404.
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H. and Stiles, M.E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* **47**, 1-24.
- Giraffa, G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 163-171.
- Knijff, E., Dellaglio, F., Lombardi, A., Andrighetto, C. and Torriani, S. (2001) Rapid identification of *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae* by PCR with primers targeted to the *ddl* genes. *J Microbiol Methods* **47**, 35-40.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, ed. Stackenbrandt, E. and Goodfellow, M. pp. 115-175. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Naser, S.M., Vancannet, M., Hoste, B., Snuwaert, C., Vandemeulebroecke, K. and Swings, J. (2006) Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus saccharominimus* Vancannet et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 413-416.
- Naser, S., Thompson, P.L., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, L., Thompson, C.C., Vancannet, M. et al. (2005) Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis. *J Clin Microbiol* **43**, 2224-2231.
- Ozawa, Y., Courvalin, P. and Galimand, M. (2000) Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine D-alanine ligases. *Syst Appl Microbiol* **23**, 230-237.
- Tsakris, A., Woodford, N., Pournaras, S., Kaufmann, M. and Doubovas, J. (1998) Apparent increased prevalence of high-level aminoglycoside resistant *Enterococcus durans* resulting from false identification by a semiautomated software system. *J Clin Microbiol* **36**, 1419-1421.
- Vancannet, M., Zamfir, M., Devriese, L.A., Lefebvre, K., Engelboom, K., Vandemeulebroecke, K., Amar, M., De Vuyst, L. et al. (2004) *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2175-2179.
- Witte, W. (2000) Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int J Antimicrob Agents* **14**, 321-325.

### **5.5 Caratteristiche biotecnologiche e di patogenicità per la nuova specie, *Enterococcus italicus***

Gli enterococchi dominano la popolazione dei NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria, batteri lattici non starter) di diversi formaggi, per questa ragione è stato supposto che essi possano contribuire positivamente allo sviluppo dell'aroma durante la maturazione del formaggio, grazie alla loro attività proteolitica, maggiore rispetto agli altri LAB, e all'idrolisi dei grassi del latte ad opera di esterasi da essi prodotte.

La caratterizzazione biotecnologica della nuova specie si è mossa quindi in questa direzione, ricercando in *E. italicus*, quelle attività enzimatiche di cui si è discusso precedentemente e che maggiormente influenzano la tipicità dei prodotti lattiero caseari.

In generale i ceppi appartenenti alla nuova specie hanno mostrato una buona capacità coagulante ed una buona acidificazione in latte. A questo non sempre ha corrisposto un buon potere proteolitico. Si sottolinea come, per quest'ultimo aspetto, è stato osservato un elevato grado di variabilità, con biotipi particolarmente interessanti e altri caratterizzati da una scarsa attività proteolitica nei confronti della caseina. E' stata valutata la capacità autolitica, caratteristica importante ai fini caseari per il rilascio del pool enzimatico che favorisce la formazione del flavour tipico di un formaggio e le proprietà superficiali delle cellule quali l'idrofobicità e l'autoaggregazione. Quest'ultima è un'attività mediata dalla natura dello strato esterno della cellula e rappresenta anche un indice per valutare la possibile positività dei ceppi in termini probiotici. Inoltre i ceppi di *E. italicus* si sono distinti per la loro incapacità di crescere in terreno

contenente sali biliari e quindi privi delle caratteristiche necessarie per sopravvivere in ambiente intestinale. La mancanza o i bassi valori di attività delle due caratteristiche appena citate, ne precludono l'uso come probiotico. Queste caratteristiche permettono di ipotizzare, anche per questa nuova specie del genere *Enterococcus*, un ruolo attivo come coltura aggiunta, nelle fasi di maturazione dei prodotti caseari.

La biotipizzazione dei ceppi di *E. italicus* ha previsto lo studio approfondito a livello genetico, e per alcune proprietà anche a livello fenotipico, di quei fattori che potrebbero contribuire a considerare anche questi nuovi enterococchi come dei potenziali patogeni opportunisti.

Sono state condotte prove fenotipiche relative alla presenza di gelatinasi e alla produzione di emolisine, i risultati mostrano come i ceppi allo studio fossero incapaci di idrolizzare la gelatina e debolmente  $\alpha$ -emolitici. Per quanto riguarda lo studio della resistenza agli antibiotici si è valutata attraverso la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) a dieci antibiotici scelti fra quelli comunemente utilizzati in ambito ospedaliero; i valori di MIC ottenuti sono stati poi confrontati con i valori di breakpoint stabiliti dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Authority, EFSA). Un microrganismo è definito sensibile quando è inibito nella crescita ad un livello inferiore o uguale al breakpoint di uno specifico antibiotico in un test fenotipico. Al contrario, un ceppo batterico è detto resistente quando la sua crescita non è inibita dalla presenza dell'antibiotico in esame. Quando la resistenza ad un antibiotico è diffusa in tutti i ceppi di una intera specie batterica, essa è considerata una resistenza intrinseca, ovvero una resistenza acquisita stabilmente a livello del genoma cellulare e come tale difficilmente

trasferibile ad altri microrganismi. *E. italicus* ha mostrato un basso profilo di resistenza nei confronti degli antibiotici saggiati. Per molti di questi inoltre è stato possibile ipotizzare una resistenza intrinseca.

A livello genotipico sono stati ricercati i geni codificanti fattori di virulenza come le citolisine, emolisine, adesine e sostanza di aggregazione, e i geni correlati alla resistenza agli antibiotici testati in *E. italicus*, per il quale non sono disponibili dati di sequenze nucleotidiche. Dopo ricerca in banca dati NCBI e in letteratura sono stati allestiti esperimenti di amplificazione specifica utilizzando i primer costruiti sulle sequenze geniche ampiamente studiate nell'ambito del genere *Enterococcus*. A questo riguardo si deve sottolineare come, soprattutto nell'ambito dei determinanti genici correlati alle resistenze agli antibiotici, sia stato possibile l'evidenziazione solo di alcuni geni, per i quali i dati bibliografici hanno mostrato una sequenza nucleotidica ben conservata, come risultato di una elevata capacità di trasferimento genico orizzontale anche a specie differenti. Si fa riferimento in particolare ai geni codificanti la resistenza alla tetraciclina. In questo caso è stato possibile correlare la manifestazione fenotipica di resistenza, posseduta da alcuni ceppi di *E. italicus*, alla presenza dei corrispondenti determinanti genici. Sapendo inoltre che negli enterococchi, l'alta capacità di trasferimento genico di tali determinanti, può essere legata alla presenza di trasposoni, è stato ricercato questo elemento mobile anche nella nuova specie. I risultati relativi a quest'ultima ricerca, hanno permesso di ipotizzare o una nuova capacità di mobilizzazione o la presenza di plasmidi coniugativi, come eventuali vettori di trasferimento genico.

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

Per quanto riguarda la ricerca, lungo il genoma di *E. italicus* degli altri geni di virulenza per i quali era dimostrabile una manifestazione fenotipica, saranno necessari ulteriori studi comprendenti soprattutto esperimenti di sequenziamento parziale del genoma della nuova specie del genere *Enterococcus*.

Questa parte del lavoro è stata svolta alla Technische Universität di Berlino, sezione di Genetica del dipartimento di Microbiologia Ambientale in collaborazione con la professoressa Elisabeth Grohmann. I risultati sono stati riuniti in una pubblicazione accettata dalla rivista *International Journal of Food Microbiology*.

Dai dati complessivi ottenuti è stato possibile ipotizzare per la nuova specie un ruolo attivo, nei formaggi artigianali saggiati, come coltura aggiunta o di integrazione, soprattutto nella fase di maturazione dei prodotti considerati. Per quanto riguarda il potenziale patogeno, questi primi dati ottenuti permettono di supporre come la presenza di *E. italicus* nei prodotti caseari sia associabile ad un basso rischio per la salute del consumatore.

Lavoro accettato dalla rivista  
**“International Journal of Food Microbiology”**  
in attesa di pubblicazione

**A survey on biotechnological potential and safety of  
the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E.  
italicus***

M. G. Fortina\*<sup>1</sup>, G. Ricci<sup>1</sup>, F. Borgo<sup>1</sup>, P. L. Manachini<sup>1</sup>, K. Arends<sup>2</sup>, K.  
Schiwon<sup>2</sup>, M. Y. Abajy<sup>2</sup> and E. Grohmann<sup>2</sup>

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

*Department of Food Science and Technology – Industrial Microbiology  
Section – University of Milan, Via Celoria 2, 20133 Milan, Italy<sup>1</sup>;  
Environmental Microbiology Genetics, University of Technology Berlin,  
Franklinstraße 29, 10587 Berlin, Germany<sup>2</sup>*

\*Correspondence to: Maria Grazia Fortina

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche,  
Sezione di Microbiologia Industriale, Università degli Studi di Milano  
Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy

Phone 0039 02 50316692

Fax 0039 02 50316694

e-mail : grazia.fortina@unimi.it

## **Abstract**

The biotechnological and safety properties of the novel enterococcal species of dairy origin, *E. italicus*, were investigated. The strains of the species showed technological characteristics related to their use as adjunct cultures in the production of artisanal cheeses. They were susceptible or poorly resistant to several clinical relevant antibiotics. Moreover, *E. italicus* strains were associated with low virulence profiles, as verified by screening for the presence of 33 different genes encoding antibiotic resistance and known virulence factors in the genus *Enterococcus*. From the data obtained, we deduce that the presence of *E. italicus* strains in cheeses

results in a low health risk and that within the species new safe adjunct cultures for the dairy industry could be found.

*Keywords:* *Enterococcus italicus*; Dairy cultures; Typing; Antibiotic resistance; Virulence genes

## **1. Introduction**

The most controversial species of lactic acid bacteria found in food products are the enterococci. They are present as a component of the natural microflora of certain foods, such as dairy products, where they may have beneficial effects (Franz et al., 1999; Giraffa, 2003; Saavedra et al., 2003; Morandi et al., 2006). Generally, the presence of enterococci throughout ripening positively affects taste, colour and the sensory profile of the full-ripened cheeses (Oumer et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2001). Bacteriocinogenic enterococci have been isolated from a variety of sources (Sarantinopoulos et al., 2002; De Vuyst et al., 2003) and used as anti-*Listeria* and anti-*Clostridium* agents in the dairy industry. Recently, specific enterococcal strains have been used as probiotic adjunct cultures in Cheddar cheese for their ability to improve the microbial balance of the intestine (Gardiner et al., 1999; Giraffa, 2003).

On the contrary, the genus *Enterococcus* is of particular medical relevance because of its increased incidence as a cause of disease in nosocomial infections and super infections such as endocarditis, bacteraemia, urinary tract, neonatal, central nervous system (CNS), intraabdominal and pelvic infections (Mannu et al., 2003; Semedo et al., 2003a; De Vuyst et al., 2003).

The differences between an enterococcal pathogen and an apparently safe food use strain are unclear, even if food enterococci, especially those of dairy origin, seem not to be associated with potentially high virulence profiles. Unfortunately, the highly efficient ability of enterococci to transfer different genes is a worrisome trait, which weakens any selection criteria (Eaton and Gasson, 2001). Since several years, there is a controversial discussion whether bacteria in food contribute to the distribution of antibiotic resistances. There is the possibility that apparently safe starter or probiotic cultures might acquire virulence factors, such as antibiotic resistance, haemolysin and cytolyisin production genes, by conjugation. The distinction between "intrinsic" and "acquired" resistance is used as indicative of the probability of resistance transfer. Consequently, the use of new enterococcal strains in food products or in probiotic preparations, merits careful safety evaluation in concomitance with the study of their technological functionality.

Raw milk is colonized by enterococci, originated from animal faeces or from contaminated habitats; their recovery and persistence in a variety of cheeses, also produced from pasteurized milk, is justified by their ability to

survive under adverse conditions, such as temperatures and salinity. *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* are the most frequently occurring enterococcal species in dairy products. Although the presence of virulence factors is strain specific, it is necessary to take into account the fact that pheromone-responsive plasmids, which often encode virulence genes and antibiotic resistance genes, are mainly carried by *E. faecalis* and in lower extent by *E. faecium*. For this reason the possibility to select new enterococcal strains rather than *E. faecalis* strains for the production of traditional cheeses from Mediterranean countries is of great importance.

In this context, our intention was to investigate a novel enterococcal species, previously described (Fortina et al., 2004), originating from artisanal Italian cheeses (Fortina et al., 2003). In this paper we studied the biotechnological capability of the species and the incidence of known virulence determinants, in order to evaluate the possibility to obtain new safe starter strains.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Bacterial strains and media*

Seven *Enterococcus italicus* strains previously recovered from two Italian cheeses (DSM 15952<sup>T</sup> = TP1.5<sup>T</sup>, TP1.3, TP2.3, TP1.D, TP3.D from Toma Piemontese, RP1, RP4 from Robiola Piemontese) (Fortina et al., 2004) and *E. faecalis* V583 (ATCC 700802) were included in this study. Enterococcal strains were grown at 37 °C in M17 or Brain Heart Infusion

(BHI) broths (Difco, Becton Dickinson, MD, USA), supplemented with 1.5% agar for the preparation of solid media.

## 2.2 *Proteolytic activity*

The amino acids/peptides accumulated in the milk at 24-48 h by the proteolytic activity of the tested strains were determined using the *o*-phthaldialdehyde method (Church et al., 1983). Results were expressed as  $\Delta OD_{340 \text{ nm}}$ .

## 2.3 *Acidifying activity*

Fresh milk cultures of each strain were inoculated at 1% in 100 ml sterile reconstituted (10% w/v) skimmed milk (Difco) pre-warmed at 37 °C. The pH was measured and recorded automatically, throughout the 48 h incubation period.  $\Delta\text{pH}$  values after 6, 12, 24 and 48 h were used to compare the acidifying activity of the strains. Two trials for each strain were carried out.

## 2.4 *Autolysis of whole cells in buffer solution*

The autolytic phenotype of the enterococcal strains was evaluated on harvested exponential phase cells ( $O.D._{600 \text{ nm}}$  0.6-0.8) grown in M17, washed and resuspended in the same buffer to an  $O.D._{600 \text{ nm}}$  of 0.5-0.6 and incubated at 37 °C. Two system buffers were tested, potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.5) and citrate buffer (50 mM, pH 5.0) both with and without 3% NaCl. The degree of autolysis was expressed as the percentage decrease of the  $O.D._{600 \text{ nm}}$  after different times.

### 2.5 Aggregation assay

This assay was performed according to Kos et al. (2003) with some modifications. Bacteria were grown at 37 °C for 18 h in M17 broth and the cells were harvested by centrifugation at 5000 *g* for 15 min, washed twice and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) to give an O.D.<sub>600 nm</sub> of 1.0, corresponding to viable counts of approximately 5x10<sup>8</sup> CFU/ml. Aggregation was evaluated at room temperature on 4 ml of cell suspension mixed by vortexing for 10 s. Every hour 0.1 ml of the upper suspension was transferred to another tube with 0.9 ml of PBS and the absorbance (*A*) was measured at 600 nm. The aggregation percentage was expressed as 1- (*A<sub>t</sub>* / *A<sub>0</sub>*) x 100, where *A<sub>t</sub>* represents the absorbance at time *t* = 1, 2, 3, 4 or 5 h and *A<sub>0</sub>* the absorbance at *t* = 0.

### 2.6 Hydrophobicity studies

The cell surface hydrophobicity of the strains was determined according to Rosenberg et al. (1980) with some modifications. Cells were harvested (late log phase from M17 medium), washed twice in PBS buffer and resuspended in 0.1 M KNO<sub>3</sub> (pH 6.2) to give a cell suspension with an O.D.<sub>600 nm</sub> of 0.5-0.6 (*A<sub>0</sub>*). Three ml of cell suspension were mixed with 1 ml of xylene. After a 10 min preincubation at room temperature, the two-phase system was mixed by vortexing for 2 min. The aqueous phase was removed after 20 min of incubation at room temperature, and its

absorbance at 600 nm ( $A_1$ ) was measured. The percentage of bacterial adhesion to solvent was calculated as  $(1-A_1/A_0) \times 100$ .

### 2.7 Bile tolerance and bile salt hydrolase activity

These tests were performed according to Saavreda et al. (2003). The tested strains were grown in LAPTg broth (g/l: peptone, 15; tryptone, 10; yeast extract, 10; glucose, 10; Tween 80, 0.1% v/v) and in LAPTgO broth (LAPTg containing 0.3% oxgall, Difco) at 37 °C. Every hour for the first 8 h and after 24 h of incubation, the absorbance at 560 nm was recorded and plotted against the incubation time (t). The time required for each of them to increase the  $A_{560}$  by 0.3 units was recorded. The difference in time (min) between the LAPTg and LAPTgO cultures was considered as the growth delay (D). The bile salt hydrolase activity was detected by the precipitation of the deconjugate bile acid around the colonies grown in LAPTg agar plates prepared by adding 0.5% (w/v) sodium glycodeoxycholate, and incubated anaerobically at 37 °C during 72 h.

### 2.8 Production of gelatinase and haemolysin

Gelatinase was detected using 3% gelatine medium (Difco). After growth for 24-48 h at 37 °C, the plates were placed at 4 °C for 5 h before examination for zones of turbidity around the colonies, indicating hydrolysis. Production of haemolysin was determined by streaking enterococcal cultures on layered fresh horse blood agar plates. Plates were incubated for 1 to 2 days at 37 °C. The haemolytic reaction was recorded by observation of a clear zone of hydrolysis around the colonies ( $\beta$

haemolysis), a partial hydrolysis and greening zone ( $\alpha$  haemolysis) or no reaction ( $\gamma$  haemolysis).

### 2.9 Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was tested by disk diffusion method (OXOID, Unipath Limited, Basingstoke, Hampshire, U.K.) in BHI agar, according to the CLSI (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS 2002). Nine different antibiotics, concentrations given in  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , were applied including vancomycin (50), tetracycline (50), kanamycin (30), streptomycin (25), ampicillin (25), chloramphenicol (50), gentamicin (30), trimethoprim (5), and rifampicin (25). The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics was determined by the broth dilution method (Andrews, 2001), after growth in M17 broth at 37 °C, using  $10^5$  cells/ml as initial inoculum. Interpretative criteria for susceptibility status were the microbiological breakpoints defined by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) for the genus *Enterococcus* (Feedap Panel, 2005).

### 2.10 DNA preparation

Total chromosomal DNA from overnight broth cultures of the different strains was extracted according to Fortina et al. (2003). To verify whether the quality of the extracted DNA was PCR grade, a PCR amplification of the 16S rRNA gene from all the bacterial strains, using the primers described by Lane (1991), was carried out.

### 2.11 PCR amplification

The presence of genes encoding different virulence factors were tested by PCR, using primers and conditions previously described or developed in this study on the basis of the reported *Enterococcus faecalis* V583 genome sequence (Paulsen et al., 2003) (Table 1). PCRs were performed in a 50 µl reaction mixture containing 200 ng bacterial DNA, 5 µl 10 X reaction buffer *GenTherm*<sup>TM</sup> (Rapidozym, Berlin, Germany), 200 µM of each dNTP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 µM each primer, and 1.5 U *GenTherm*<sup>TM</sup> DNA-polymerase (Rapidozym). Amplifications were carried out using a PCR-Cycler Primus 96 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) and for *asa* gene a T-Gradient cyler (Whatman Biometra, Göttingen, Germany). Thermocycler reactions for *asa* amplification were as follows: initial cycle of 94 °C for 2', 10 cycles of 94 °C for 30'', 50 °C for 1', 68 °C for 7', 22 cycles of 94 °C for 30'', 50 °C for 1', 68 °C for 10 min, a final extension step of 68 °C for 10 min. The cycles used for *cyll*, *EF1249-fbp*, *EF2380-maz* and *EF 2662-cbp* were 94 °C for 2' for the first cycle; 94 °C for 1', 55 °C for 1'(52 °C for *EF 2662-cbp*), 72 °C for 2' for the next 35 cycles; and 72 °C for 10 min for the last cycle. Positive control strain was *E. faecalis* V583 (Paulsen et al., 2003).

Amplification products were separated on a 1 % agarose gel stained with ethidium bromide in 1 x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer and photographed.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Technological characteristics*

The results for acid production after 12 and 24 h of growth in milk at 37 °C are shown in Fig. 1. After 12 h of growth only 3 out of the 7 strains

examined reduced the pH below 5.9. After 24 h of growth the pH values ranged from 5.4-5.1. The higher pH values and therefore the slower acidifiers were *E. italicus* strains isolated from Robiola Piemontese. The poor acidifying capacity shown by *Enterococcus* species other than *E. faecalis* has been already reported by other authors (Sarantinopoulos et al., 2001) and could be related to the usefulness of the enterococci of dairy origin as adjunct cultures in the production of artisanal cheeses. Regarding casein degradation, the strains tested showed low proteolytic activity (Fig. 1), which is in agreement with results obtained for other enterococcal species (Suzzi et al., 2000; Sarantinopoulos et al., 2001). No clear relationships were observed between proteolytic and acidifying activities; however, the Robiola isolates showed the lower  $\Delta OD_{340\text{ nm}}$ .

The autolytic ability of *E. italicus* strains was firstly evaluated in phosphate buffer at pH 6.5 after 72 h of incubation; the prolongation of the time of starvation had not significant effect on the extent of autolysis. The extent of autolysis appeared to be a strain dependent character, ranging between 20 and 40 %. To determine the extent of autolysis at a pH value and salinity resembling the cheese ripening conditions, the strains were tested at pH 5.0 and in presence of 3% NaCl; this caused an decrease in autolysis, with levels ranging from 10% to 30%. These values are compatible with the potential role of the strains as adjunct cultures.

### 3.2 Probiotic properties

A relatively new frontier in the probiotic technology is the use of cheeses as delivery systems of probiotic strains and fermented dairy products

enriched with probiotic bacteria have developed into one of the most successful categories of functional foods (Saxelin et al., 2005; Bergamini et al., 2006; Parvez et al., 2006). For this reason, we tested some properties required for a probiotic microorganism, including adhesion ability, bile tolerance, bile salts deconjugation.

To assess the potential adhesion ability, we studied autoaggregation and hydrophobicity properties, two bacterial traits that could be predictive of adhesiveness of probiotic bacteria: autoaggregation appears to be necessary for adhesion to intestinal epithelial cells, and physicochemical characteristics of the cell may affect autoaggregation and adhesion to different surfaces (Del Re et al., 2000; Kos et al., 2003). The sedimentation rate of the strains tested was measured over a period of 5 h. Results showed that all strains tested exhibited a moderate autoaggregation phenotype, with values ranging from 17 to 30%. All strains showed a strong affinity for xylene, an apolar solvent, demonstrating hydrophobic cell surface of these strains.

Bile tolerance is an important characteristic of LAB used as dietary adjuncts since it enables the probiotic strains to survive and exert their beneficial action in the host. All *E. italicus* strains showed *D* values higher than 60 min indicating the low potentiality of this species to overcome the gastrointestinal environment, compared to the bile tolerance found for other studied *E. faecalis* and *E. faecium* strains tested (Saavedra et al. 2003). According to bile tolerance results, the strains tested showed little or no bile salts hydrolase activity.

### 3.2 Antibiotic resistance and virulence traits

After a preliminary investigation by using an agar diffusion assay, antibiotic susceptibility of the strains was evaluated by MIC determination in M17 broth (Table 2). All strains were susceptible to kanamycin and ampicillin.

They were inhibited at the break-point level of chloramphenicol (MIC = 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), gentamicin (MIC = 512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and streptomycin (MIC = 1024  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

A low resistance to vancomycin was observed (break-point 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), with MIC values ranging from 10 to 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . All strains were resistant to a high level of trimethoprim (ranging from 150 to 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and rifampicin (ranging from 50 to 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Regarding tetracycline resistance ( $\text{Tc}^r$ ), the response was variable within the species. Three strains showed a low level of resistance (20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), whereas the remaining 4 isolates showed MIC values  $>150 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

In general the low resistance rates detected in the new enterococcal species are remarkable: all strains were susceptible or poorly resistant to 6 antibiotics, comprising the clinical relevant antibiotics ampicillin, vancomycin and gentamicin and a low incidence of resistance toward tetracycline was observed. The strains show a common resistance to rifampicin and trimethoprim; this fact could indicate that these resistances could be intrinsic to the species. If further studies will provide that the genes conferring resistance are not associated with mobile genetic elements, the risk of horizontal transfer of rifampicin and trimethoprim

resistance to other organisms can be considered as minimal.  $\beta$ -haemolysis, as well as gelatinase activity, was not observed in any of the tested strains.

### 3.3 Detection of resistance and virulence genes

The potential pathogenicity of the new species was evaluated investigating the presence of 33 genes encoding virulence factors, referring to virulence determinants studied for other enterococcal species, either of human and veterinary, or food origin (Table 1). *E. faecalis* V583 was used as positive internal control.

Until nowadays cytolysin is still one of the most studied virulence traits attributed to enterococci. For its production a complex determinant encoding five gene products is necessary (*cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *cyIL<sub>1</sub>*, *cyIL<sub>2</sub>*); a sixth gene (*cyII*) encodes a protein responsible for immunity (Semedo et al., 2003b). Since silent genes have been reported for several enterococcal species (Eaton and Gasson, 2001; Semedo et al., 2003b), the molecular screening of *cyl* genes is also recommended for non-haemolytic strains. *E. italicus* strains, that did not show haemolytic activity, also seemed to be free of *cyl* genes.

According to their low adhesion ability, the strains did not possess any of the genes encoding adhesion-associated proteins in enterococci (*ace*, *agg*, *asa*, *esp*, *efaA<sub>fmv</sub>*, *efaA<sub>fs</sub>*, *prgB*). The products of the *agg* and *asa* genes, the most well studied adhesins (AS) of the enterococci, also mediate binding of donor cells to plasmid free recipients, promoting high-efficiency conjugation (Muscholl-Silberhorn, 1999; Toledo-Arana, et al., 2001; Semedo et al., 2003a)

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

The strains did not possess *gelE*, the gene encoding an extracellular metalloendopeptidase that could contribute to virulence in enterococci due to its ability to hydrolyze biologically active peptides (Nakayama et al., 2002).

We also focused our attention on two novel putative binding protein genes (*EF2662-cbp*; *EF1249-fbp*) and a zinc metalloprotease gene (*EF2380-maz*) by screening the *E. faecalis* V583 genome (Paulsen et al., 2003) available at the website of the National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Also for these genes, PCR amplification results were negative for all *E. italicus* strains.

The strains tested harboured an RP (ribosomal protection protein) *tet* gene, according to the resistance phenotype. However, while the majority of the enterococcal strains show the presence of *tetM* gene (Huys et al., 2004; Hummel et al., 2007), in the new species *E. italicus*, *tetS* seems the dominant Tc<sup>r</sup> determinant (Table 2). In all cases *tetS* was associated with the *tetK* gene, encoding an efflux pump protein (EP); both RP and EP genes have been referred as important mechanisms of tetracycline resistance and have been described frequently associated in the same strain (Aarestrup et al., 2000; Del Campo et al., 2003). The 4 strains for which the MIC was the highest (150 µg ml<sup>-1</sup>) also harboured the *tetM* gene (Table 2). The combined presence of these genes could explain the higher level of Tc<sup>r</sup> exhibited by the strains. In many enterococci and streptococci of clinical or food origin, *tetM* genes occur more frequently on conjugative transposons, particularly on members of the broad-host-range Tn916-Tn1545

conjugative transposon family (Clewell et al., 1995; Huys et al., 2004). Interestingly, the tetM positive *E. italicus* strains did not contain the *int-Tn* gene, indicating that these strains could use a different mechanism, other than conjugative transposition, for the dissemination of tetM genes.

Although a high incidence of gentamicin-resistance has been shown among food enterococci and a chloramphenicol resistance is often associated with Tc<sup>r</sup> (Teuber et al., 1999; Franz et al., 2001; Hummel et al., 2007), *E.italicus* strains seem to be free of the respective determinants, according to the phenotypic data. The *E. italicus* isolates did not possess any of the *van* genes tested.

In conclusion, our results show that *E. italicus* strains do not seem to be associated with potentially virulence profiles, when compared with clinical strains. Therefore, their presence in traditional cheeses results in a low health risk. We suppose that these strains could represent new safe adjunct cultures for the dairy industry. However, we are aware that further studies on natural ability of this new species to acquire and transfer extrachromosomal elements within its genus and with other less related bacteria are necessary before the statement can be made that the presence of *E. italicus* in cheese has no effect on food safety. Plasmid transfer studies are now in progress in our laboratories.

### **Acknowledgements**

The financial support of Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) (Prin 2004) is gratefully acknowledged.

## References

- Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infection Diseases* 37, 127-137.
- Andrews, M. J., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, Suppl. S1, 5-16.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Zalazar, C.A., 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. *International Dairy Journal* 16, 856-866.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Portier, D. H., Catignani, G. L., 1983. Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science* 66, 1219-1227.
- Clewell, D.B., Flannagan, S.E., Jaworski, D.D., 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiology* 3, 229-236.
- De Barbeyrac, B., Dupon, B., Rodriguez, P., Renaudin, H., Bebear, C., 1996. A Tn1545-like transposon carries the *tet(M)* gene in tetracycline resistant strains of *Bacteroides ureolyticus* as well as *Ureoplasma*

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

*urealyticum* but not *Neisseria gonorrhoeae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 37, 223-232.

Del Campo, R., Ruiz-Garbajosa, P., Sanchez-Moreno, M.P., Baquero, F., Torres, C., Canton, R., Coque, T.M., 2003. Antimicrobial resistance in recent faecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. Microbial Drug Resistance 9, 47-60.

Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology 31, 438-442.

De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M. R., Revets, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. International Journal of Food Microbiology 84, 299-318.

Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology 33, 24-27.

Eaton, T. J., Gasson, M. J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology 67, 1628-1635.

FEEDAP Panel, 2005. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of the

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance (Question N° EFSA-Q-2004-079) EFSA Journal 223, 1-12.

Fortina, M. G., Ricci, G., Mora, D., Manachini, P. L., 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1717-1721.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini P. L., 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. Food Microbiology 20, 397-404.

Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Applied and Environmental Microbiology 67, 4385-4389.

Gardiner, G. E., Stanton, C., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., 1999. Evaluation of Cheddar cheese as a good carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. Journal of Dairy Science 82, 1379-1387.

Gevers, D., Danielsen, M., Huys, G., Swings, J. 2003. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Applied and Environmental Microbiology 69, 1270-1275.

- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 215-222.
- Hummel, A., Holzapfel, W.H., Franz, C. M.A.P., 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 1-7.
- Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.-M., Swings, J., 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied Environmental Microbiology* 70, 1555-1562.
- Kao, S.M., Olmsted, S.B., Viksnins, A.S., Gallo, J.C., Dunny, G.M., 1991. Molecular and genetic analysis of a region of plasmid pCF10 containing positive control genes and structural genes encoding surface proteins involved in pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 173, 7650-7664.
- Kim, S.-R., Nonaka, L., Suzuki, S., 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters* 237, 147-156.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S., 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94, 981-987.
- Lane, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley & Sons, New York, pp. 115-175.

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R., 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from northwest Italian dairy products. *International Dairy Journal* 16, 867-875.
- Muscholl-Silberhorn, A.B., 1999. Cloning and functional analysis of Asa373, a novel adhesin unrelated to the other sex pheromone plasmid-encoded aggregation substances of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology* 34, 620-630.
- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Duh, R.-W., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 2000. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. *Infection and Immunity* 68, 5210-5217.
- Nakayama, J., Kariyama, R., Kumon, H., 2002. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Applied Environmental Microbiology* 68, 3152-3155
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement, M100-S12, vol. 22. No. 1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, P.A. (January).

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

- Oumer, B. A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., Nunez, M., 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *Journal of Dairy Research* 68, 117-129.
- Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.-Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1171-1185.
- Paulsen, I.T., Banerjee, L., Myers, G.S.A., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., et al., 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071-2074.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29-33.
- Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F., de Valdez, G. F., 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 88, 241-245.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11, 621-647.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M. D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2002. Bacteriocin

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. International Journal of Food Microbiology 72, 125-136.

Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W., 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Current Opinion in Biotechnology 16, 1-8.

Semedo, T. Santos, M. A., Lopes, M. F. S., Marques, J. J. F., Barreto Crespo, M. T., Tenreiro, R., 2003a. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? Systematic and Applied Microbiology 26, 13-22.

Semedo, T., Santos, M. A., Martins, P., Lopes, M. F., S., Marques, J. J. F., Tenreiro, R., Crespo, M. T. B., 2003b. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. Journal of Clinical Microbiology 41, 2569-2576.

Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F., 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 115-137.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R., Lasa, I., 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology 67, 4538-4545.

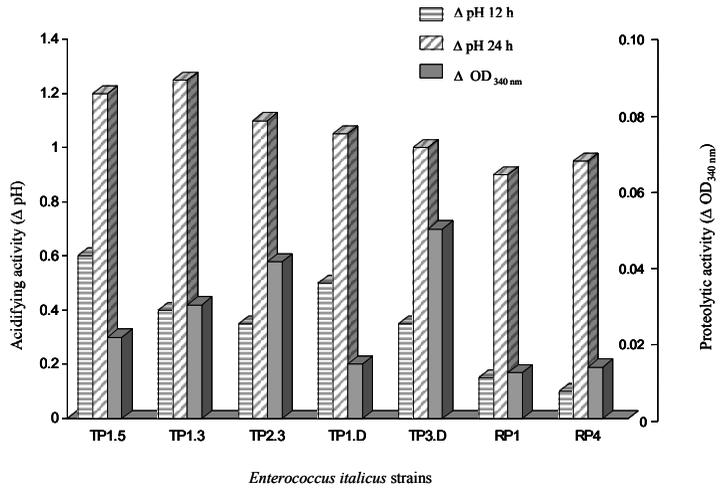
5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

Vakulenko, S.B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A.M., Zervos, M.J., Lerner, S.A., Chow, J.W., 2003. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 1423-1426.

Figure 1

Acidifying and proteolytic activity of *Enterococcus italicus* tested strains.

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*



5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

Table 2

Phenotypic and genotypic resistance properties of *Enterococcus italicus* strains

<i>E. italicus</i> strains <sup>a</sup>	Antibiotic resistance MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) <sup>b</sup>							Identified resistance determinants
	Cm (8) <sup>c</sup>	Gen (512)	Rif (4)	Str (1024)	Tet (16)	Tmp (8)	Van (8)	
TP1.5	10	10	100	5	20	150	10	<i>tetS</i> , <i>tetK</i>
TP1.3	10	10	50	1000	150	150	16	<i>tetS</i> , <i>tetM</i> , <i>tetK</i>
TP2.3	8	8	50	1000	150	150	16	<i>tetS</i> , <i>tetM</i> , <i>tetK</i>
TP1.D	8	8	50	1000	20	500	20	<i>tetS</i> , <i>tetK</i>
TP3.D	10	10	50	400	20	500	20	<i>tetS</i> , <i>tetK</i>
RP1	8	8	50	1000	150	125	16	<i>tetS</i> , <i>tetM</i> , <i>tetK</i>
RP4	8	8	200	1000	200	125	16	<i>tetS</i> , <i>tetM</i> , <i>tetK</i>

<sup>a</sup> All strains were susceptible to kanamycin and ampicillin and negative for *int-Tn*, *tetL*, *cat*, *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia* genes

<sup>b</sup> Abbreviations: Cm, chloramphenicol; Gen, gentamicin; Rif, rifampicin; Str, streptomycin; Tet, tetracycline; Tmp, trimethoprim; Van, vancomycin

<sup>c</sup> Susceptibility breakpoint ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) for *Enterococcus*, defined by the Feedap Panel (2005).

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

Table 1

PCR primers and conditions used for the detection of genes implicated in antibiotic resistance and virulence in *Enterococcus italicus* strains

Gene(s)/ product(s)	Primer pair (5'-3')	Amplicon (bp)	References
Tetracycline resistance:			
<i>int-Tn</i> (transposase of Tn916-Tn1545)	F: TGACTCTGCCAGCTTTAC	579	De Barbeyrac et al. (1996)
	R: CCATAGGAACCTTGACGTTCC		
<i>tetM</i> (ribosomal protection protein)	F: GTTAAATAGTGTTCTTGAG	656	Kim et al. (2004)
	R: CTAAGATATGGCTCTAACAA		
<i>tetS</i> (ribosomal protection protein)	F: CATAGACAAGCCGTTGACC	667	Kim et al. (2004)
	R: ATGTTTTTGGAACGACAGAG		
<i>tetL</i> (efflux protein)	F: GTMGTTGCGCCTATATCC	696	Gevers et al. (2003)
	R: GTGAAMGRWAGCCCACCTAA		

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>tetK</i> (efflux protein)	F: TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA R: AAAGGGTTAGAACTCTTGAAA	348	Gevers et al. (2003)
Chloramphenicol resistance			
<i>cat</i> (chloramphenicol acetyltransferase)	F: ATGACTTTTAATATTATRAWTT R: TCATYTACMYTATSAATTATAT	648	Hummel et al. (2007)
Vancomycin resistance			
<i>vanA</i> (D-ala-D-lac ligase)	F: GGGAAAACGACAATTGC R: GTACAATGCGGCCGT TA	732	Dukta-Malen et al. (1995)
<i>vanB</i> (D-ala-D-lac ligase)	F: ATGGGAAGCCGATAGTC R: GATTTCGTTCTCGACC	635	Dukta-Malen et al. (1995)
<i>vanC1</i> (D-ala-D-serine ligase)	F: GGTATCAAGGAAACCTC R: CTTCCGCCATCATAGCT	822	Dukta-Malen et al. (1995)

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>vanC2</i> (D-ala-D-serine ligase)	F: CTCCTACGATTCTCTTG R: CGAGCAAGACCTTTAAG	439	Dukta-Malen et al. (1995)
Aminoglycoside resistance			
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> (acetyl-phosphotransferase)	F: CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG R: CCTCGTGAATTCATGTTCTGGC	348	Vakulenko et al. (2003)
<i>aph(2'')-Ib</i> (phosphotransferase)	F: CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC R: GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCTT	867	Vakulenko et al. (2003)
<i>aph(2'')-Ic</i> (phosphotransferase)	F: CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC R: CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	Vakulenko et al. (2003)

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>aph(2'')-Ia</i> (phosphotransferase)	F: GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC R: CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	Vakulenko et al. (2003)
<i>aph(3')-IIIa</i> (phosphotransferase)	F: GGCTAAAATGAGAATATCACCGG R: CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	523	Vakulenko et al. (2003)
<i>ant(4')-Ia</i> (adenylyltransferase)	F: CAAACTGCTAAATCGGTAGAAGCC R: GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	Vakulenko et al. (2003)
<b>Hemolytic activity</b>			
<i>cyIA</i> (activation of cytolysin)	F: TAGCGAGTTATATCGTTCCTACTGTA R: CTCACCTCT TTGTATTTAAGCATG	1282	Semedo et al. (2003a)
<i>cyIB</i> (transport of cytolysin)	F: AAGTACACTAGTAGAACTAAGGGA R: ACAGTGAACGATATAACTCGCTATT	2020	Semedo et al. (2003a)

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>cy/I</i> (cytolysin immunity protein)	F: GCGGTGACAGAGGTGAGAATAAAATAGATG	983	This study
	R: CTTGCGCCGCGCTGGTTTCTTATCTCAAT		
<i>cy/L<sub>i</sub></i> (cytolysin precursor)	F: GATGGAGGGTAAGAATTATGG	253	Semedo et al. (2003a)
	R: GCTTCACCTCACTAAGTTTTATAG		
<i>cy/L<sub>s</sub></i> (cytolysin precursor)	F: GAAGCACAGTGCTAAATAAGG	240	Semedo et al. (2003a)
	R: GTATAAGAGGGCTAGTTTCAC		
of cytolysin) Adhesion, aggregation, colonization ability	F: AAAAGGAGTGCTTACATGGAAGAT	2940	Semedo et al. (2003a)
	R: CATAACCCACACCACTGATTCC		
<i>ace</i> (collagen binding protein)	F: GCGGTGACGGGTGAATAATTTTTGACAA	2024	Nallapareddy et al. (2000)
	R: GCGCGGCCGCTGGCTTTTCTATTGTTAATTCTT		

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>agg</i> (aggregation substance)	F: AAGAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	Eaton and Gasson (2001)
	R: AACGGCAAGACAAGTAAATA		
<i>asa</i> (aggregation substance)	F: GGCCTCGACCATGAAGCAACAACAGA	3890	This study
	R: GCGCGGCCGCAATTATTTGTTTCTT		
<i>efaA<sub>f5</sub></i> (cell wall adhesin)	F: GACAGACCCTCACGAATA	705	Eaton and Gasson (2001)
	R: AGTTCATCATGCTGTAGTA		
<i>efaA<sub>f<sub>m</sub></sub></i> (cell wall adhesin)	F: AACAGATCCGCATGAATA	735	Eaton and Gasson (2001)
	R: CATTCATCATCTGATAGTA		

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>esp</i> (surface protein )		F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	Eaton and Gasson (2001)
<i>prgB</i> (surface protein)		F: GCCGTCGACTCGAGGAGAATGATACATGAAT R: CCTGCGGCCGCGTCCTTCTTTTCGTCTTCAA	3917	Kao et al. (1991)
<i>EF2662-cbp</i> (choline binding protein)		F: GCGTCGACCACTTAAACTGATAGAGAGGAAT R: CGGCCCGCAATTAATTATTAAGTTTCC	1121	This study
<i>EF1249-fbp</i> (fibrinogen binding protein)		F: GCGGTCGACAAACGAGGGATTTATTATG R: CTGGCGGCCGCGTTTAATACAATTAGGAAGCAGA	1712	This study
Hydrolytic enzymes				
<i>gelE</i> (extracellular metalloendopeptidase )		F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTCCATC	419	Eaton and Gasson (2001)

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

<i>EF2380-maz</i> (membrane-associated zinc metalloprotease)	F: GCGGTCGACGACATCTATGAAAACAAT R: TCCGCGCCGCCTTAACTTTCTCCTT	1268	This study
--------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------	------	------------

---

## **5.6 Plasmidi e trasferimento genico orizzontale in *Enterococcus italicus***

Lo studio del profilo plasmidico dei microrganismi presenti nei prodotti alimentari è di notevole importanza, soprattutto per quanto riguarda i batteri che compongono le colture starter naturali aggiunte nella produzione lattiero casearia. Bisogna infatti valutare quanti siano i plasmidi presenti, quali funzioni ricoprano e quale sia la loro stabilità. Inoltre la presenza di molecole di DNA extracromosomale permette di valutare un altro aspetto di biodiversità genotipica.

Per la nuova specie *E. italicus*, dopo aver messo a punto un protocollo di lisi che permettesse di ottenere una buona resa di DNA extramolecolare, è stato determinato il profilo plasmidico. Una successiva analisi elettroforetica bidimensionale ha consentito l'individuazione dell'esatto numero di plasmidi in forma CCC e del loro relativo peso molecolare. Si è evidenziato che ad eccezione del ceppo type, gli isolati allo studio possiedono molecole di DNA extracromosomale, in numero variabile da tre a sette molecole, con un peso molecolare compreso tra 1,6 e 17 kb. Inoltre, l'analisi del profilo ottenuto ha evidenziato la presenza di plasmidi ad alto peso molecolare in quattro ceppi, confermata poi mediante elettroforesi del DNA purificato con ultracentrifugazione in gradiente di cloruro di cesio.

Il principale motivo per cui la presenza degli enterococchi nelle matrici alimentari, e quindi anche quella di *Enterococcus italicus*, è considerata discutibile è l'alta efficienza di questi microrganismi nel trasferire diversi geni, in particolare quelli correlati alle antibiotico-resistenze. Per questo motivo, al fine di valutare se la presenza di questa

nuova specie all'interno di una matrice alimentare possa rappresentare un rischio per la salute del consumatore, l'attenzione è stata focalizzata sullo studio genotipico volto alla localizzazione dei determinanti genici correlati ai fenomeni di resistenza.

Per confermare i risultati delle amplificazioni condotte in precedenza (Fortina *et al.*, 2007), che hanno dimostrato la presenza dei determinanti genici relativi alla resistenza alla tetraciclina in alcuni ceppi di *E. italicus* e per ottenerne una precisa localizzazione, sono stati eseguiti esperimenti di ibridazione molecolare su membrana. I risultati ottenuti evidenziano una localizzazione a livello cromosomale dei geni *tetS*, *tetK* e *tetM*. Ricorrendo a preparazioni concentrate e purificate di DNA plasmidico e allestendo esperimenti di ibridazione Dot Blot, è stato inoltre possibile rilevare come il gene *tetM* sia portato dai ceppi di *E. italicus* non solo a livello cromosomale, ma anche su molecole plasmidiche.

Poiché nei ceppi *tetM*<sup>+</sup> di *E. italicus* non è stata riscontrata la presenza di trasposoni specifici per la mobilitazione di *tetM*, la ricerca è proseguita mettendo a punto esperimenti di coniugazione, impiegando i ceppi di *E. italicus* sia come donatori che recipienti, al fine di meglio comprendere se il bagaglio plasmidico dei ceppi potesse essere costituito anche da molecole plasmidiche con proprietà coniugative, volta a stimolare il trasferimento genico orizzontale. Le prove sono state condotte sia in terreno selettivo che nella matrice complessa latte sempre in presenza di selezione.

Le colonie dei potenziali transconiuganti sono state sottoposte a caratterizzazione molecolare, al fine di verificarne l'identità, attraverso l'ausilio di sonde specie-specifiche per la cellula donatrice/ricevente e da

amplificazioni specifiche per i geni coinvolti nell'antibiotico-resistenza che si intendeva trasferire con queste prove.

In questo modo, si è verificato il comportamento di *E. italicus*: da un lato una stimata attitudine ad acquisire geni da altri ceppi in co-coltura, dall'altro la sua incapacità di fungere da donatore nei processi di trasferimento genico orizzontale messi a punto.

Questo approccio molecolare i cui risultati, inviati alla rivista *International Dairy Journal*, e svolti in parte alla Technische Universität di Berlino, sezione di Genetica del dipartimento di Microbiologia Ambientale in collaborazione con la professoressa Elisabeth Grohmann, hanno permesso di ottenere le prime indicazioni riguardanti il potenziale di trasferimento genico di questa nuova specie di enterococco di interesse nel settore caseario.

L'insieme dei risultati ottenuti in questa ricerca, unitamente a quelli ottenuti in precedenza nei nostri laboratori, permettono di affermare che la presenza di *Enterococcus italicus* in matrici casearie non comporta rischi per la salute dei consumatori e che ceppi selezionati di questa nuova specie possono essere ulteriormente studiati al fine di ideare nuove colture selezionate, atte a preservare la tipicità del prodotto da cui sono stati isolati.

Lavoro inviato alla rivista

**"International Dairy Journal"**

## ***Enterococcus italicus*: plasmid distribution and potential of tetracycline resistance conjugal transfer**

**F. Borgo<sup>1</sup>, G. Ricci<sup>1</sup>, K. Arends<sup>2</sup>, K. Schiwon<sup>2</sup>, E. Grohmann<sup>2</sup> and M. G. Fortina\*<sup>1</sup>**

*Department of Food Science and Technology – Industrial Microbiology Section – University of Milan, Via Celoria 2, 20133 Milan, Italy<sup>1</sup>; Environmental Microbiology Genetics, University of Technology Berlin, Franklinstraße 29, 10587 Berlin, Germany<sup>2</sup>*

\* Corresponding author. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Sezione di Microbiologia Industriale, Università degli Studi di Milano Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy. Tel: +39 02 50 31 91 31;

Fax: +39 02 50 31 91 31

*E-mail address:* [grazia.fortina@unimi.it](mailto:grazia.fortina@unimi.it)

Running title: *Enterococcus italicus* plasmid and their tetracycline transfer

### **Abstract**

In this study the genetic location and the possible conjugal transfer of the tetracycline antibiotic resistance determinants, *tetM*, *tetS* and *tetK*, from the new species *Enterococcus italicus* isolated from typical Italian cheeses were investigated. Hybridization analysis revealed that the genes are located in chromosomal DNA. The plasmid profiling discovered that there was a variable presence of plasmids: one plasmid free strain and the remaining with several plasmids differentiated by the number and the molecular weight. One of these plasmids showed the presence of *tet M* gene. The ability of this species to play a role in horizontal transfer system, like a donor or recipient, was investigated using different mating experiments. The aim of this study was to evaluate the potential hazard of *Enterococcus italicus* isolated from cheeses and the results of this research showed that the new *Enterococcal* species was able to acquire but not to transfer antibiotic resistance by conjugation at the frequencies  $10^{-5}$  for recipient. The data presented in this research explained the low health risk of *Enterococcus italicus* in food chain.

*Keywords:* *Enterococcus italicus*; Plasmid; Tetracycline resistance; Horizontal gene transfer.

## 1. Introduction

In the last years there is been an increasing interest to Enterococci as reservoirs and vehicles of antibiotic resistance (Franz *et al.*, 1999; Wilcks *et*

*al.*, 2005). As lactic acid bacteria, the genus *Enterococcus* is naturally present in the gastrointestinal systems of mammals, but it is also found in soil and fecally polluted waters and on vegetables (Leclerc *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 2002). On the one hand, enterococcal species has been recognized as emerging human pathogens mostly in nosocomial but also in community-acquired infections (Morrison *et al.*, 1997). On the other hand, *Enterococcus* strains play a positive role in the manufacturing of various fermented milk product harboring specific biochemical traits, and some strains are technologically exploited functional starters or probiotics as reported by Giraffa *et al.* (1997). The large use of antibiotics in agriculture and veterinary has increased the number of food enterococci that have developed resistance to various therapeutic antibacterial agents (Giraffa *et al.*, 2000). It is possible that these commensal bacteria act as vectors for the dissemination of antibiotic resistance determinants via the food chain to the consumer, a risk that has so far been poorly addressed. The antibiotic resistance genes are associated with mobile genetic elements, and their transfer could occur through plasmid conjugation system. Examples are pRE39, a pAMBeta-like conjugative plasmid out of a meat isolate of *Enterococcus* sp. (Teuber, 2001), and the multiresistance plasmid pK214 found in *Lactococcus lactis* from a raw milk soft cheese (Perreten *et al.*, 1997).

In this context, in a previous study (Fortina *et al.*, 2007b), we investigated the antibiotic resistance and virulence profile of *E. italicus*, a novel species isolated from typical Italian cheeses (Fortina *et al.*, 2004). This new species has been characterized from multi drug resistance profile but the

genotypic assessment detected only tetracycline determinants, such as *tetS* and *tetM* (ribosomal protection proteins) and *tetK* (efflux pump). The current study was set out to investigate the plasmid profiles of new species food borne *E. italicus* and potential of these extrachromosomal DNA, carrying tetracycline resistance genes, in conjugation system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and media

The tetracycline resistant *E. italicus* strains, carrying *tet(S)*, *tet(M)*, *tet(K)* genes, isolated as described previously (Fortina *et al.*, 2007b), *E. faecalis* JH 2-2 rifampicin and acid fusidic resistant strain (Rif<sup>r</sup>, Fus<sup>r</sup>: BCCM /LMG 19456, Bacteria Collection, Ghent University, Ghent) and *E. faecalis* JH2-2 harboring plasmid pIP501 rifampicin, acid fusidic and chloramphenicol resistant strain (Rif<sup>r</sup>, Fus<sup>r</sup>, Cm<sup>r</sup>: collection of the Institute of Environmental Microbiology Genetics, University of Technology, Berlin) were used in this study. The strains were identified using species-specific PCR probe, described in Fortina *et al.*(2007a) and Dutka-Malen *et al.* (1995) respectively. Antibiotics (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) were used in the following concentration: tetracycline hydrochloride, 25 µg ml<sup>-1</sup>; fusidic acid, 25 µg ml<sup>-1</sup>; chloramphenicol, 25 µg ml<sup>-1</sup>. All bacteria studied were maintained by transfer in M17 + 1% glucose (Difco, Detroit, MI, USA) with incubation at 37°C and storage between at 4°C.

### 2.2. PCR amplification of antibiotic resistance genes

Total DNAs of each strain were extracted under the conditions described by Fortina *et al.* (1990). Genes responsible for resistances

towards tetracycline [*tet(M)*, *tet(S)*, *tet(K)*], were amplified by PCR using primers and amplification conditions described previously in M. G. Fortina *et al.*, 2007. PCR products were subjected to electrophoresis on 1% agarose gel.

### 2.3. Plasmid isolation and purification

For plasmid DNA isolation, the alkaline extraction procedure was used as described by Anderson and McKay (1983). Agarose gel electrophoresis and evaluation of gels were performed as described by Sambrook *et al.*, (1989). For each plasmid-bearing strain, a second-dimension electrophoresis of the plasmid preparation for a further analysis of CCC and OC forms was performed according to Hintermann *et al.* (1981). The molecular mass of the CCC plasmids were determinate using Supercoiled DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Plasmid purification was obtained by ultracentrifugation to equilibrium in a caesium chloride-ethidium bromide gradient (CsCl-EtBr).

### 2.4. Hybridization analysis

The PCR-amplified fragments were DIG-dUTP labeled by random priming with a labeling kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), used as probes in hybridization experiments and transferred onto a Hybond-*N* nylon membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Milan, Italy; Sambrook *et al.*, 1989). The probes were detected by chemiluminescent detection using CSPD (Roche) and the signals were visualized by exposure to X-ray film.

### 2.5. Conjugation assays

*Filter mating.* The *E. italicus* strain harboring plasmid *tet(M)* gene was used in filter matings with *E. faecalis* JH 2-2 and *E. faecalis* JH 2-2 pIP501 according with the protocol described by Huys *et al.* (2004). One ml of a culture of the donor or recipient strain grown overnight in selective M17 + 1% glucose broth (Difco) at 37°C was added to selective 5 ml of fresh M17 + 1% glucose and further incubated to the mid-exponential phase of growth (approx. 4h). Donor and recipient bacteria were combined with an 1:10 and 1:1 respectively ratio and mixed and filtered through a sterile membrane filter with a pore size of 0.45 µm ( Sartorius, Goettingen, Germany) and incubated at 37°C. Filters were incubated on M17 + 1% glucose agar (15 g l<sup>-1</sup>) for overnight at 37 °C, and after mating, cells were washed from the filter with 1 ml of 0.9 % NaCl solution. Dilutions of the mating mixtures were spread onto agar plates containing double appropriate selective medium for transconjugants ( M17 + 1% glucose) and incubated for 24-48 h at 37°C. Upon growth, potential transconjugants colonies were picked from the plate and inoculated into double selective M17 + 1% glucose and incubated over night at 37 °C. To determine the transfer frequency, both the donor and the recipient were diluted in a 10-fold dilution series and enumerated by spread plating onto appropriate selective medium agar. The mating experiments were triplicate repeated. Selected in vitro transconjugants were stored at -20 °C.

*Direct plate conjugation (DPC) mating.* The direct plate conjugation was performed according to Blaiotta *et al.* (2000). To prepare cells for the test, inoculations of 1 ml were carried out into fresh broth M17 + 1% glucose from overnight-grown cultures. Donor and recipient were incubated to the mid-exponential phase (4 h) at 37°C. The mating mixture consisted of 1 ml either donor or recipient cells and 3 ml of skim milk (Difco, 10 % w/v). The tube was incubated over night at 33°C with gentle shaking. The 1 ml of mixture was divided into five aliquots and spread onto selective plates.

*Milk agar plates mating.* This method was carried out according to McKay *et al.* (1980). The growth conditions of the donor and recipient cells and the washing procedure of the filter were reported above. The mixture filter was collected on skim milk (Difco, 10 % w/v) agar (15 g ml<sup>-1</sup>). After overnight incubation at 37°C the cells as described above were recovered and spread after a 10-fold dilution series over the surface of the selective plates.

## 2.6. Frequency of transfer and molecular typing of transconjugants

Transfer frequencies were expressed as the number of transconjugants per recipient cfu. The fingerprints of transconjugants, obtained by PCR, were compared to the fingerprints of recipient strains for confirmation purposes.

## 3. Results and discussions

### 3.1. Distribution of plasmids in *Enterococcus italicus* strains

The *E. italicus* tested strains were shown to bear plasmids with the exception of the type strains TP 1.5<sup>T</sup>, DSMZ 15952 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany), while the remaining isolates were heterogeneous for the relative presence of plasmids. The strains showed a high number of extrachromosomal DNA, up to seven different molecules with a size ranging between 1.7 and major 17 kb (Table 1). It is interesting to note the presence of high weight plasmid associable to horizontal transfer *via* conjugation.

Table 1

Plasmid profiling of *Enterococcus italicus* strains

Strains	No. of plasmids	Molecular weight (kb)
TP 1.3	7	17,6; 13,7; 11; 6; 3,1; 2; 1,7
TP 2.3	7	17,6; 13,7; 11; 6; 3,1; 2; 1,7
TP 1.D	7	11,4; 9,7; 5,8; 5; 3,7; 3,4; 1,9
TP 3.D	3	11,7; 5,1; 2
RP 1	3	14; 11,5; 9,3
RP 4	3	14; 11,5; 9,3

### 3.2. Position of tetracycline determinants through hybridization analyses

To investigate the location of tetracycline determinants on *E. italicus* DNA, we performed Southern hybridization on chromosomal DNA and Dot Blot analyses on purified plasmid DNA, employing as probes, *tetS*, *tetK* and *tetM* genes. The molecular evidence of the observed tetracycline resistant phenotypes was tested by PCR as reported in Fortina *et al.* (2007).

As shown in Table 2, *tetK* and *tetS* genes were detected on chromosomal DNA of tested strains and the second gene was found out also on RP 1 and RP 4 purified plasmid DNA. On the contrary, *tetM* gene gave positive hybridization with TP 1.3, TP 2.3, RP 1 and RP 4 chromosomal DNA and the plasmid purified DNA of the last two strains. It is to underline that these strains, as reported in Fortina *et al.* (2007), have had the higher MIC concentration of tetracycline resistance. The presence of more than one antibiotic resistance determinants on DNA could improve the resistance mechanisms.

Table 2

Distribution of *tet* determinants in *Enterococcus italicus* strains

Strain	Chromosomal DNA	Plasmid DNA
TP 1.3	<i>tetS</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i>	
TP 2.3	<i>tetS</i> , <i>tetK</i> , <i>tetM</i>	
TP 1.D	<i>tetS</i> , <i>tetK</i>	
TP 3.D	<i>tetS</i> , <i>tetK</i>	

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

---

RP 1	<i>tetS, tetK, tetM</i>	<i>tetM, tetS</i>
RP 4	<i>tetS, tetK, tetM</i>	<i>tetM, tetS</i>

---

### 3.3. Horizontal transfer genes from and in food isolates

We investigated the possibility of the new species food borne *E. italicus* to be a reservoir or vehicle of antibiotic resistance. For these reasons we performed conjugation experiments using *Enterococcus italicus* RP4 strain with plasmid harboring *tetM* gene either as recipient or donor cell. No transfer of tetracycline resistance from RP4 (Tet<sup>+</sup>) to *E. faecalis* JH 2-2 (Rif<sup>+</sup>, Fus<sup>+</sup>) plasmid free was found. We observed transconjugants after experiments carried out using like donor *E. faecalis* JH 2-2 (Rif<sup>+</sup>, Fus<sup>+</sup>, Cm<sup>+</sup>) harboring conjugative plasmid pIP501 to RP4 (Tet<sup>+</sup>). The transfer frequency found in each conjugative experiments: filter mating, direct plate conjugation mating and milk agar plates mating was ranging 10<sup>-4</sup>-10<sup>-5</sup> per recipient (Table 3). In all cases of transfer, the genetic determinant of tetracycline resistance detected in the transconjugants (TCs) was identical to the determinant present in the recipient isolate that had produced the TCs.

*Enterococcus italicus* RP4 strain was not able to transfer its tetracycline resistance determinant but it acquired the plasmid harboring chloramphenicol determinant coming from *Enterococcus faecalis* JH 2-2 pIP501.

5. Approccio polifasico tassonomico e caratterizzazione della nuova specie *Enterococcus italicus*

Table 3  
Transfer frequency

Donor cell	Plasmid	Recipient cell	Plasmid	Filter mating	DPC mating	Milk agar plates mating
<i>Enterococcus italicus</i> RP4	<i>tetM,tetS</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> JH 2-2	/	/	/	/
<i>Enterococcus faecalis</i> JH 2-2	<i>cat</i>	<i>Enterococcus italicus</i> RP4	<i>tetM,tetS</i>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>

### 3.4. Concluding remarks

The described antibiotic resistance and the virulence profiles (Fortina *et al.*, 2007b) correlate to the presence of the antibiotic determinants, indicating that the novel species *Enterococcus italicus* could be considered a emergent pathogen. It is known that the bacteria pathogenicity is related not only to the presence of the specific gene but also to its mobilization ability. We studied the localization of tetracycline determinants in *E. italicus* and their horizontal transferment via plasmid conjugation. The plasmid profile obtained indicate a high number of this molecules and a high level of diversity. Hybridization analysis showed that a considerable fraction of *tet* genes is on chromosomal DNA of *E. italicus* but only *tetM* gene on a plasmid. Further studies on this extrachromosomal DNA will permit to understand the role of these cryptic plasmids. When considering all the results on *E. italicus* donor and recipient potential, it can be

suggested that this species can act as reservoir organism of acquired antibiotic resistance genes but it's not able to transfer its plasmids in other bacteria. Therefore the data obtained through conjugation assay demonstrate that the presence of this species in the food chain is low health risk. It is expected that these new insights will contribute to the definition of well-argued safety requirements for the appropriate use of *Enterococcus* strains as food starter cultures.

### **Acknowledgements**

This research was carried out under financial support from the Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) (Italy). We thank E. Grohmann for the excellent technical assistance with the conjugation techniques and for *Enterococcus faecalis* JH2-2 and *E. Faecalis* JH2-2 pIP501.

### **References**

- Anderson, D.G. and McKay, L.L. (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl Environ Microbiol* **46**: 549-552.
- Blaiotta, G., Ercolini, D., Simeoli, E., Moschetti, G. and Villani, F. (2000) Conditions for conjugative transposon transfer in *Lactococcus lactis*. *Lett Appl Microbiol* **31**: 343-348.
- Leclerc, H., Devriee, L.A. and Mossel D.A.A. (1996) Taxonomical change in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J Appl Bacteriol* **81**: 459-466.

Dutka-Malen, S., Evers, S. and Courvalin, P. (1995) Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 24-27.

Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F. and Manachini, P.L. (2007a) Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. *Lett Appl Microbiol* **44**: 443-446.

Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y. and Grohmann, E. (2007b) A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *Int J Food Microbiol*, in press.

Hintermann, G., Fischer, H.M., Crameri, R. and Hutter, R. (1981) Simple procedure for distinguish CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* **5**: 371-373.

Huys, G., D'Haene, K., Collard, J.M. and Swings J. (2004) Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1555-1562.

McKay, L.L., Baldwin, K.A. and Walsh, P.M. (1980) Conjugal transfer of genetic information in group N Streptococci. *Appl Environ Microbiol* **40**: 84-91.

Petersen, A., Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T. and Dalsgaard, A. (2002) Impact of integrated fish farming on antimicrobial resistance in a pond environment. *Appl Environ Microbiol* **68**:6036-6042.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety. *Int J Food Microbiol* **47**, 1-24.

Wilcks, A., Andersen, S.R. and Licht, T.R. (2005) Characterization of

transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. FEMS Microbiol Lett **243**: 15-19. Morrison, D., Woodford, N. and Cookson, B. (1997) Enterococci as emerging pathogens of humans. J Appl Bacteriol Symp Suppl **83**: 89S-99S.

Giraffa, G., Carminati, D. and Neviani, E. (1997) Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potential technological use. J Food Microbiol **60**: 732-737.

Giraffa, G., Olivari, A.M. and Neviani E. (2000) Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. Food Microbiol **17**: 671-677.

Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D. and Manachini P.L. (2004) Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **54**, 1717-1721. Teuber, M. (2001) Veterinary use and antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology **4**, 493-499.

Perreten, V., Schwarz, F., Cresta, L., Boeglin, M., Dasen, G. and Teuber, M. (1997) Antibiotic resistance spread in food. Nat **389**, 801-802.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### **Bibliografia**

**Arihara K., Cassens R.G. and Luchansky J.B.** (1993). Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol, **19**: 123-134.

**Batish V.K. and Ranganathan B.** (1986). Antibiotic susceptibility of deoxyribonuclease-positive enterococci isolated from milk and milk

product and their epidemiological significance. *Int J Food Microbiol*, **3**: 331-337.

**Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D. and Noller H.F.** (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **148**: 107-127.

**Centeno J.A., Menendez S., Hermida M. and Rodriguez-Otero J.L.** (1999). Effects of the addition of *E. faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int J Food Microbiol*, **19**: 123-134.

**Clewell D.B.** (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol*, **9**: 90-102.

**Collins M.D., Jones D., Farrow J.A.E., Steckelberg J.M. and Murray B.E.** (1984). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov. and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **34**: 220-223.

**Coque T.M., Patterson J.E., Steckelberg J.M. and Murray B.E.** (1995). Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from the feces of hospitalized and community-based person. *J Infect Dis*, **171**: 1223-1229.

**De la Cruz F. and Davies J.** (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiol*, **8**: 128-133.

**De Vaux A., Laguerre G., Divies C. and Prevost H.** (1998). *Enterococcus asini*, sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus Asinus*). *Int Syst Bacteriol*, **48**: 383-387.

**Devriese L.A., Pot B. and Collins M.D.** (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species group. *J Appl Bacteriol*, **75**: 339-408.

**Devriese L.A. and Pot B.** (1995). The lactic acid bacteria, the genera of lactic acid bacteria, the genus *Enterococcus*. In: "Wood", B.J., B., Holzapfel W.H., Eds: Blackie Academic, London, **2**: 327-367.

**Edwards S.T. and Sandine W.E.** (1981). Public health significance of amines in cheese. *J Dairy Sci*, **64**: 2431-2438.

**Ennahar S. and Deschamps N.** (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*, **88**: 449-457.

**Farrow J.A.E. and Collins M.D.** (1985). *E. hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int J Syst Bacteriol*, **35**: 73-75.

**Fortina M.G., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A. e Manachini P.L.** (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol*, **20**:397-404.

**Fortina M.G., Ricci G., Mora D. and Manachini P.L.** (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, **54**:1717-1721.

**Fortina M.G., Ricci G., Borgo F., Manachini P.L., Arends K., Schiwon K., Abay M.Y. and Grohmann E.** (2007). A survey on biotechnological potential

and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. Italicus*. Int. J Food Microbiol, in press.

**Franz C.M.A.P., Holzapfel H.W. and Stiles E.M.** (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? Int J Food Microbiol, **24**: 1-24.

**Gardini F., Martuscelli M., Caruso M.C., Galgano F., Crudele M.A., Favati F., Guerzoni M.E. and Suzzi G.** (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. Int J Food Microbiol, **4**: 105-117.

**Garg S.K. and Mital B.K.** (1991). Enterococci in milk and milk products. Crit Rev Microbiol, **18**: 15-45.

**Gatti M., Fornasari E., Carminati D., Giraffa G. and Neviani E.** (1994). Gli enterococchi nei formaggi italiani: attività biochimiche e significato tecnologico. Ind Latte, **30**: 11-27.

**Grohmann E., Muth G. and Espinosa M.** (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, **67**: 277–301.

**Guzman C.A., Pruzzo C., Plate M., Guardati M.C. and Calegari L.** (1991). Serum dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesions involved in the colonization of heart cells. Microbial Pathogen, **11**: 399-409.

**Jett B.D., Huyke M.M. and Gilmore M.S.** (1994). Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev, **7**: 462-478.

**Johnson A.P.** (1994). The pathogenicity of enterococci. J Antimicrobiol Chemother, **33**: 1083-1089.

- Joosten H.M., Nunez M., Devreese B., Van Beeumen J. and Marugg J.D.** (1996). Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA 4. *Appl Environm Microbiol*, **62**: 4220-4223.
- Leclercq R.** (1997). Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*, **24**: 80-84.
- Lowe A.M., Lambert P.A. and Smith A.W.** (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun*, **63**: 703-706.
- Manalopoulou E., Sarantinopulos P., Zoidou E., Aktypis A., Moschopoulou E., Kandarakis I.G. and Anifantakis E.M.** (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *Int J Food Microbiol*, **82**: 153-161.
- Morrison D., Woodford N. and Cookson B.** (1997). Enterococci as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol Symposium Supplement*, **83**: 89-99.
- Murray B.E.** (1990). The life and times of *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev*, **3**: 46-65.
- Orla-Jensen** (1919). The lactic acid bacteria. Hestet Son, Copenhagen.
- Perreten V., Kollofel B. and Teuber M.** (1997). Conjugal transfer of the Tn916-like transposon TnF01 from *Enterococcus faecalis* isolated from cheese to the other Gram-positive bacteria. *Syst Appl Microbiol*, **20**: 27-38.
- Robredo B., Singh K.V., Baquero F., Murray B.E. and Torres C.** (2000). Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int Food Microbiol*, **54**: 197-204.

**Schleifer K.H. and Kilpper-Bälz R.** (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int Syst Bacteriol, **34**: 31-34.

**Shankar V., Baghdayan A.S., Huycke M.M., Lindahl G. and Gilmore M.S.** (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. Infect Immun, **67**: 193-200.

**Shankar V., Lockatell C.V., Baghdayan A.S., Drachenberg C., Gilmore M.S. and Johnson D.E.** (2001). Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract. Infect Immun, **69**: 4366-4372.

**Simjee R.J. and Gill M.J.** (1997). Gene transfer, gentamycin resistance and enterococci. J Hosp Infect, **36**: 249-259.

**Singh K.V., Coque T.M., Weinstock G.M. and Murray B.E.** (1998). In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. FEMS Immunol Med Microbiol, **21**: 323-331.

**Stiles M.E. and Holzapfel W.H.** (1997). Lactic and acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int Food Microbiol, **36**: 1-29.

**Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M.E., Andrighetto C. and Lanorte M.T.** (2000). A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). J Appl Microbiol, **89**: 267-274.

**Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.J., Cucarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penadés J.R. and Lasa I.** (2001). The Enterococcal

surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. Appl Environ Microbiol, **67**: 4538-4545.

**Torri Tarelli G., Carminati D. and Giraffa G.** (1994). Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. Food Microbiol, **11**: 243-252.

**Villani F. and Coppola S.** (1994). Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. Ann Microbiol Enzimol, **44**: 97-105.

**Williams A.M., Rodriguez U.M. and Collins M.D.** (1991). Intrageneric relationship of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small sub-unit rRNA. Res Microbiol, **142**: 67-74.

**Zareba T.W., Pascu C., Hryniewicz W. and Wadstrom T.** (1997). Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. Curr Microbiol, **34**: 6-11.

**6.**  
**Sicurezza d'uso e**  
**tipizzazione di**  
***Lactococcus***  
***garvieae* in**  
**prodotti caseari**  
**italiani**



## 6.1 Il genere *Lactococcus*

I lattococchi sono tra i più importanti batteri lattici nell'ambito del settore caseario. Essi sono stati ritrovati come popolazione microbica dominante in molti formaggi prodotti senza l'aggiunta di colture selezionate. La loro presenza ed il loro ruolo sono già stati ampiamente studiati in formaggi prodotti artigianalmente, quali il Pecorino sardo ed il Camembert. Da questi studi è emerso come anche per questo gruppo batterico esista un ampio grado di biodiversità fenotipica e genotipica, responsabile della tipicità dei vari prodotti artigianali, che può essere sfruttato per selezionare nuovi ceppi di interesse biotecnologico.

I lattococchi sono stati inizialmente ascritti al genere *Streptococcus* (gruppo N di Lancefield). In seguito a studi filogenetici condotti da Sandine (1985) e Stackebrandt & Teuber (1985), è risultata evidente la necessità di ricorrere a successive divisioni tassonomiche: piogeni, pneumococchi, orali, fecali, lattici e altri streptococchi.

Questa classificazione, adottata nel "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", è stata ulteriormente modificata in seguito agli studi condotti da Schleifer *et al.* (1988) basati sulla determinazione della sequenza nucleotidica del gene 16S rDNA, da esperimenti di ibridazione molecolare DNA-DNA, reazioni immunoenzimatiche, composizione lipidica della membrana cellulare e della parete.

Questi studi hanno portato all'ottenimento di tre diversi generi:

- *Streptococcus*
- *Enterococcus*
- *Lactococcus*

Nell'ambito del genere *Streptococcus* sono rimasti gli streptococchi piogeni, orali e anaerobi oltre alla specie *S. thermophilus*, *S. salivarius*, *S. bovis* e *S. uberis*.

Nell'ambito del genere *Enterococcus* sono stati ascritti gli streptococchi fecali, quali *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e tutte le specie di successiva descrizione ad essi correlati.

Al genere *Lactococcus* fanno riferimento gli streptococchi lattici, fra cui *L. lactis*, *L. raffinolactis* e specie di più recente affiliazione quali *L. plantarum* e *L. garvieae*, quest'ultimo inizialmente classificato come *Enterococcus seriolicida*.

Il genere *Lactococcus* comprende batteri di forma coccoide, Gram positivi, con metabolismo omofermentante (trasformazione degli esosi in acido lattico attraverso la via di Embden-Meyherhof-Parnas EMP, senza liberazione di gas). Ad esso vengono associate caratteristiche fenotipiche, quali l'incapacità di crescere a 10°C e 45°C, in presenza di NaCl al 6,5% e a pH 9,6.

Studi più approfonditi hanno mostrato che queste caratteristiche, ritenute un tempo distintive, possono essere proprie anche di generi affini, in particolare *Streptococcus* ed *Enterococcus* (Correler *et al.*, 1998). Per tale motivo oggi, per una più sicura identificazione, è necessario ricorrere a test maggiormente selettivi, quali le prove sierologiche e le caratteristiche genotipiche.

Relativamente agli studi antigenici, i lattococchi vengono facilmente separati dagli enterococchi per l'antigene polisaccaridico N

(gruppo di Lancefield), rispetto all'antigene D caratteristico del genere *Enterococcus* (Sneath *et al.*, 1996).

Per quanto riguarda gli studi genotipici, oltre ai classici esperimenti di determinazione della sequenza nucleotidica dell'rRNA 16S, oggi possono venire impiegati metodi molecolari più rapidi che si basano sulla reazione a catena della DNA polimerasi, quali per esempio l'analisi della regione spaziatrice dell'operone ribosomale, che a volte permette non solo di risalire con certezza al genere di appartenenza, ma anche alla specie (Collins *et al.*, 1989; Mangin *et al.*, 1999; Deasy *et al.*, 2000).

Il genere *Lactococcus* comprende cinque specie:

- *L. lactis*
- *L. raffinolactis*
- *L. piscium*
- *L. garvieae*
- *L. plantarum*

*L. lactis* è sicuramente la specie più importante dal punto di vista biotecnologico. Si suddivide in tre sottospecie: *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis* con la biovar *diacetylactis*.

Così come per il genere, anche nell'ambito delle diverse specie si possono incontrare delle difficoltà qualora si cerchino dei caratteri fenotipici distintivi. Anche in questo caso è meglio ricorrere a studi genotipici: l'ibridazione molecolare DNA/DNA ad esempio fornisce i dati

più sicuri per differenziare una specie dall'altra (Stackebrandt & Goebel, 1994), più difficile risulta l'individuazione della subspecie. Questo è da tenere in particolare considerazione nell'ambito dei lattococchi, dove le subspecie *lactis* e *cremoris* sono le più importanti a livello applicativo.

Alcuni ricercatori hanno proposto l'idrolisi dell'arginina, la crescita in presenza del 4% di NaCl e a 40°C, come test distintivi per le due subspecie in questione (Garvie *et al.*, 1981). Altri hanno messo a punto un terreno differenziale contenente un colorante, cloruro di trifeniltetrazolio (TTC), sul quale la subspecie *cremoris* dà delle colonie bianche mentre *L. lactis* subsp. *lactis* si colora in seguito alla riduzione del colorante (Turner *et al.*, 1963). Tuttavia con l'aumentare degli studi sulla biodiversità ci si è resi conto che anche nell'ambito delle specie *L. lactis*, e quindi delle sue subspecie, esiste un grado di polimorfismo fenotipico tale da impedire di considerare una qualche caratteristica fisiologica come marker differenziale. Questo ha portato ad approfondire le indagini a livello molecolare con la messa a punto di diverse sonde specifiche in grado di distinguere in modo rapido e sicuro queste due subspecie (Correler *et al.*, 1999; Garde *et al.*, 1999).

## 6.2 La specie *Lactococcus garvieae*

La storia della specie *L. garvieae* è alquanto insolita. La sua descrizione iniziale risale alla prima metà degli anni '80, quando fu isolata da un caso di mastite sub-clinica in Inghilterra. Questo è uno dei pochi casi dove tale microrganismo viene riportato in bibliografia, sia come agente mastitogeno, sia in altri contesti (Fortina *et al.*, 2003a).

Durante la prima metà degli anni '90 un altro caso, questa volta dovuto a sepsi generalizzata di trote iridee allevate in Italia e in Spagna, è ricondotto alla specie *L. garvieae*, anche se un'indagine retrospettiva indica che questa specie non dovrebbe essere considerata come patogeno nei pesci.

Erroneamente, questa specie non fu mai identificata con analisi scientifiche appropriate e fu ascritta al genere *Enterococcus* con il nome di *seriolicida* (Kusuda *et al.*, 1991; Eldar *et al.*, 1996) ma riclassificata in base ad esperimenti sull'rRNA 16S e ibridazione DNA/DNA (Eldar *et al.*, 1999; Ravelo *et al.*, 2003).

Zlotkin *et al.* (1998) riporta una metodica di amplificazione specifica in grado di distinguere *L. garvieae* dalle altre specie del genere *Lactococcus*.

L'analisi contemporanea di materiale archiviato mostra come *L. garvieae* sia presente, in Estremo Oriente, come patogeno per i pesci da oltre cinquant'anni. Per quanto detto finora in letteratura sono reperibili lavori che trattano solo di ceppi di questa specie isolati da pesci. Tali studi mostrano come i vari ceppi costituiscano un gruppo geneticamente omogeneo (90% di omologia genetica), tuttavia è presente un alto livello di diversificazione fenotipica e dal punto di vista biochimico sono stati distinti 13 biogruppi.

Per questo motivo, fino a pochi anni fa *L. garvieae* era ritenuta una specie del settore ittico e, per i ricercatori di questa aria scientifica, un potenziale patogeno emergente, anche se il significato clinico della sua presenza, deve essere ancora ulteriormente studiato, in particolare per quanto riguarda i possibili fattori di virulenza da esso

posseduto(Charpentier & Courvalin, 1999; Eynogor *et al.*, 2004). Questo aspetto riveste grande importanza se si considera che in questi ultimi anni *L. garvieae* è stato ritrovato anche nel settore caseario, in associazione con *L. lactis*, sia come componente minore (Garvie *et al.*, 1981; Collins *et al.*, 1983) sia come popolazione dominante.

Le tecnologie di preparazione della maggior parte dei formaggi tradizionali italiani, tra cui molti a Denominazione di Origine Protetta, prevedono la trasformazione diretta del latte crudo. L'impiego di tale materia prima, senza l'adozione di trattamenti termici di risanamento, consente lo sviluppo nella matrice casearia di una popolazione microbica autoctona che rappresenta un fattore di tipicità del prodotto stesso. Tuttavia il ruolo di alcuni ecotipi batterici non è ancora del tutto chiarito, sia per quanto riguarda il contributo alla definizione di prodotto finito, sia per quanto concerne una potenziale patogenicità ad essi correlabili.

Recentemente, il nostro gruppo di ricerca ha riscontrato *L. garvieae* come componente dominante in campioni da latte crudo sia vaccino che caprino, destinati rispettivamente alla produzione di Toma piemontese e Caprino lombardo, e in campioni di cagliata e di prodotto finito (Fortina *et al.*, 2003; Foschino *et al.*, 2006).

L'isolamento selettivo e la successiva identificazione tassonomica sono stati ottenuti attraverso l'impiego di alcune metodologie di elevato potere discriminante, quali l'analisi della regione spaziatrice dell'operone ribosomale, il sequenziamento del gene 16S rDNA e l'impiego di sonde specie-specifiche.

Sui biotipi di nuovo isolamento sono stati condotti studi preliminari riguardanti caratteristiche fenotipiche, proprietà biotecnologiche ed alcuni aspetti negativi che potrebbero essere legati alla loro presenza in matrici alimentari. Le conoscenze fin'ora possedute su questa specie ci portano a porci alcuni quesiti:

- Il latte e i suoi derivati potrebbero essere considerati un habitat abituale per questa specie? Il fatto che solo recentemente *L. garvieae* sia stato riscontrato nel settore caseario potrebbe essere imputabile all'impiego di tecniche di caratterizzazione di scarso potere discriminante, quali quelle fenotipiche, che hanno portato a confonderlo con la specie *L. lactis*?
- la presenza predominante di *L. garvieae* in alcune tipologie di formaggi potrebbe essere correlata alla tipicità del prodotto finito? E' noto, infatti che fra i batteri lattici i non starter, soprattutto in prodotti da latte crudo, giocano un ruolo fondamentale durante la fase di maturazione conferendo al prodotto finito i flavours che ne determinano la tipicità;
- qual'è la relazione fra la presenza di *L. garvieae* nei prodotti caseari e la salute del consumatore? In particolare, quali fattori generalmente legati a fenomeni di virulenza in *L. garvieae* potrebbero essere riscontrati in ceppi di questa specie isolati da formaggio? Per questo motivo è necessario proseguire negli studi di tipizzazione della questa specie, al fine soprattutto di chiarire quali rapporti esistono tra presenza di *L. garvieae* e la sicurezza d'uso dell'alimento.

### **6.3 Tipizzazione fenotipica, tecnologica e profilo di virulenza di *L. garvieae* isolato da prodotti caseari**

La ricerca di risposte alle domande sopra formulate è stata avviata durante un progetto finanziato dal Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca (Prin 2004), in collaborazione con altri gruppi di ricerca dell'Università degli Studi di Milano, di Torino e di Udine, dal titolo "La

sicurezza nella tipicità di prodotti alimentari di origine animale: individuazione e studio di ecotipi batterici contaminanti emergenti”.

I risultati ottenuti hanno portato dapprima ad una presentazione dei dati al convegno internazionale “*Food Micro*” (Bologna , 2006), il cui abstract è riportato nelle pagine seguenti, e in un secondo momento ad una pubblicazione su rivista internazionale (Fortina *et al.*, 2007).

Per lo studio della specie sono state considerate innanzitutto alcune caratteristiche fenotipico-biotecnologiche possedute da numerosi isolati da matrice casearia, in comparazione con isolati da pesce e con il ceppo type di riferimento *L. garvieae* DSM 20684<sup>T</sup>. Tutti i ceppi in esame hanno mostrato possedere le medesime caratteristiche fisiologiche, quali crescita a 40°C, a pH 9,6 e in presenza del 4% di NaCl. La capacità di utilizzare il lattosio ha permesso invece una netta e importante suddivisione in due gruppi in funzione della nicchia ecologica di isolamento: solo i ceppi provenienti da formaggio hanno dimostrato di possedere tale attività. La valutazione della capacità acidificante in latte ha confermato il raggruppamento descritto prima, a differenza invece del potere proteolitico che è risultato comparabile in tutti i ceppi in esame.

La potenziale patogenicità dei ceppi caseari è stata valutata mediante analisi del grado di resistenza ai diversi antibiotici: i ceppi si sono dimostrati sensibili alla vancomicina e kanamicina, mentre hanno mostrato livelli alti di resistenza alla tetraciclina. Di tali resistenze sono stati ricercati a livello molecolare *via* PCR i relativi determinanti genici, evidenziando la presenza dei geni *tetS* e *tetM* e relativo trasposone *Int-Tn* deputato ad un loro potenziale trasferimento (Fortina *et al.*, 2007).

3.1 Fermented foods: traceability, labels and role of native microbes (P)

**Detection and typing of *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus xylosus* characterizing natural fermentations of Italian dairy products and sausages**

M. Grazia Fortina<sup>1</sup>, Mauro Borghi<sup>1</sup>, Francesca Borgo<sup>1</sup>, M.Teresa Bottero<sup>4</sup>, Tiziana Civera<sup>4</sup>, Luca Cocolin<sup>2</sup>, Paola Dolci<sup>3</sup>, Roberto Foschino<sup>1</sup>, Lucilla Iacumin<sup>2</sup>, Claudia Picozzi<sup>1</sup>, Giovanni Ricci<sup>1</sup>, P.Luigi Manachini<sup>1</sup>, Giuseppe Zeppa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università di Milano, Italy, <sup>2</sup>Dip. di Scienze degli Alimenti, Università di Udine, Italy, <sup>3</sup> Dip. di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Università di Torino, Italy, <sup>4</sup> Dip. di Patologia Animale, Università di Torino, Torino, Italy

Keywords: fermented products, strain typing, food typicity

The study arises from a close collaboration among researchers who have the same aim of understanding the role of autochthonous microbial populations responsible for the typical properties of several traditional cheeses (Toma piemontese DOP, Robiola, Caprino Lombardo) and natural fermented sausages (salami friulani). Following the dynamic changes in the bacterial population during production, it was determined which are the species more represented and those more correlated with the typicality of these products. Based on the results obtained, we focused our attention on *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecium*, *E. italicus* (a new enterococcal species) and *Staphylococcus xylosus* strains. The isolates were characterized by using tests with a high discriminatory power, such as analysis of the polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacers, restriction analysis and partial sequencing of housekeeping genes, AFLP, Sau-PCR and RAPD analysis. Moreover, investigation on the phenotypic and biotechnological properties of the isolates affecting the flavor and structure of foods, such as the acidification rate, proteolysis and lipolysis, were carried out. We also evaluated the presence of some phenotypic characteristics correlated to the expression of virulence factors, such as antibiotic resistance, production of biogenic amines, gelatinase and haemolytic activity. Lastly, experiments with the aim to detect the presence of specific genetic determinants encoding these virulence factors, through specific amplification tests and/or Southern hybridization were performed as well.

Acknowledgements: the financial support of Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) (Prin 2004) is gratefully acknowledged.

#### **6.4 Lo studio dei cluster genici per l'utilizzo del lattosio e del galattosio in *L. garvieae* come discriminante fra le diverse nicchie d'isolamento**

Nel precedente studio sulle caratteristiche biotecnologiche di *L. garvieae* è stato evidenziato come sia possibile, nell'ambito della specie, discriminare differenti biotipi sulla base della loro nicchia ecologica di isolamento. Questo fattore discriminante è relativo ad un carattere fenotipico che potrebbe essere correlato alla capacità di adattamento dei ceppi ad uno specifico habitat: l'utilizzazione del lattosio. Questa proprietà è risultata infatti presente solo nell'ambito degli ecotipi di origine casearia. Sulla base dei risultati ottenuti, si è inteso proseguire nella ricerca, allestendo studi fenotipici in grado non solo di confermare la diversità evidenziata, ma anche e soprattutto di permettere l'ottenimento di più stabili e affidabili marker genetici. L'attenzione è stata focalizzata sui cluster genici relativi alla utilizzazione del lattosio e del galattosio.

Nei batteri lattici molti sono i geni coinvolti nel trasporto e nell'utilizzo di questi due carboidrati (de Vos & Vaughan, 1994; Grossiord *et al.*, 1998): il lattosio ad esempio può essere metabolizzato attraverso il sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasico (PEP-PTS) in combinazione con la fosfo- $\beta$ -galattosidasi e/o attraverso il sistema della lattosio permeasi nella quale la  $\beta$ -galattosidasi ha il compito di idrolizzare tale zucchero.

Il galattosio viene solitamente degradato attraverso una galattosio permeasi e la via di Leloir, che comprende diverse attività enzimatiche,

quali: galattochinasi, galattosio-1-fosfouridil-trasferasi e UDP-glucosio-4-epimersi. A complicare le cose è il fatto che nell'ambito delle diverse specie di batteri lattici, i due cluster non presentano la stessa localizzazione genica, ed in alcuni casi, geni relativi all'utilizzazione del galattosio sono presenti all'interno dell'operone *lac* (Vaughan *et al.*, 2001; Fortina *et al.*, 2003b).

In questo contesto si tenga infine presente che non sono reperibili in banca dati, sequenze relative a tali geni per la specie *L. garvieae*. La strategia di lavoro è stata dunque quella di disegnare coppie di primer degenerati a livello di regioni conservate dei geni codificanti  $\beta$ -galattosidasi, fosfo- $\beta$ -galattosidasi e lattosio permeasi ottenute mediante analisi di sequenza comparative di differenti specie di batteri lattici. E' stata così possibile allestire esperimenti di amplificazione *via* PCR ed ottenere i relativi ampliconi per la specie *L. garvieae*. Previa analisi di sequenza degli ampliconi ottenuti e l'impiego di "vectorette libraries" specifiche è stato possibile ottenere il sequenziamento di regioni discrete del cromosoma di *L. garvieae*. Tale ricerca ha portato ai seguenti importanti risultati:

- *L. garvieae* sembra avere un singolo sistema di degradazione del lattosio, caratterizzato dalla presenza di un trasportatore di lattosio e dall'idrolisi dipendente dal sistema fosfoenolpiruvato-fosfotrasferasico combinato con la fosfo- $\beta$ -galattosidasi;
- questo sistema, presente solo nei ceppi di origine casearia e assente in quelli isolati da pesce, può essere utilizzato come marker genetico per distinguere i due biotipi provenienti dalle

differenti nicchie ecologiche attraverso una semplice amplificazione *via* PCR;

- l'alto grado di omologia fra i geni *lacE* e *lacG* di *L. garvieae* e *L. lactis*, suggerisce un possibile trasferimento orizzontale dei geni *lac* fra questi batteri lattici;
- *L. garvieae* presenta un sistema di utilizzo del galattosio costituito da una galattosio permeasi e dagli enzimi della *via* Leloir. Questa organizzazione e la relativa sequenza nucleotidica dei geni coinvolti è simili all'operone *gal* di *L. lactis* subsp. *cremoris*. Quest'ultimo microrganismo possiede un'organizzazione genica differente da tutti gli altri operoni *gal* descritti in letteratura nei lattococchi (Grossiord *et al.*, 2003).

Questi risultati, inviati alla rivista *International Dairy Journal*, permettono di discriminare i ceppi isolati da formaggio rispetto a quelli di origine ittica in funzione della loro nicchia di isolamento e rappresentano il primo studio su sequenze nucleotidiche, al di fuori del gene 16S rDNA, per la specie *L. garvieae*.

**The study of lactose and galactose gene clusters in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing biotypes from different ecological niches**

**G. Ricci, F. Borgo, P. L. Manachini and M. G. Fortina**

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università di Milano,  
Milan, Italy*

**Running title:** A genetic marker for *L. garvieae* ecotypes

*Correspondence to:* Maria Grazia Fortina

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche

Sezione di Microbiologia Industriale,

Università degli Studi di Milano

Via Celoria 2, 20133 Milano, Italy

Phone 0039 02 50319131

Fax 0039 02 50319191

e-mail : [grazia.fortina@unimi.it](mailto:grazia.fortina@unimi.it)

## ABSTRACT

**Aims :** To find genetic markers for distinguishing *Lactococcus garvieae* biotypes coming from different ecological niches.

**Methods and Results:** Thirty-two *L. garvieae* isolates, previously recovered from artisanal Italian cheeses, 12 fish isolates and the type strain of the species were studied. By employing several degenerate oligonucleotides and by constructing different vectorette libraries, we found that the isolates from the two different niches tested can be easily distinguished on the basis of the phospho- $\beta$ -galactosidase gene, detectable in all isolates of dairy origin, but lacking in all fish strains. Moreover, we obtained information regarding the way of galactose and lactose utilization in *L. garvieae*.

**Conclusions :** The diversity found among *L. garvieae* strains coming from the two different ecological niches can be exploited for the obtainment of "ecotype"- specific genetic markers.

**Significance and Impact of the Study:** This is one of the first reports concerning the determination of nucleotide sequence of genes, other than the 16S rDNA gene, in *L. garvieae*. This study should be considered as a preliminary step in a continuous effort to explore the genome of this species, with the aim to know the real relationship between the presence of *L. garvieae* in dairy products and food safety.

**Keywords:** *Lactococcus garvieae*; dairy cultures; genetic marker, lactose and galactose genes, vectorette library.

## INTRODUCTION

*Lactococcus garvieae* is considered as an emerging pathogen of increasing clinical significance in the field of fish farming (Eyngor *et al.* 2004; Kawanishi *et al.* 2006). It has also been isolated from clinical specimens of human blood, urine and skin (Furushita *et al.* 2003), indicating the expanding importance of this bacterium in the field of veterinary and human medicine. Few reports on pathogenicity of *L. garvieae* in yellowtails indicate the cell capsule as the most important virulence factor in this species (Yoshida *et al.* 1997; Ooyama *et al.* 2002). However, deepened studies on *L. garvieae* have not been carried out. This is an important point, principally after the detection of *L. garvieae* in many food products. Particularly, this organism has been isolated in the dairy environment either as nondominant species (Teixeira *et al.* 1996; Prodromou *et al.* 2001), or as prevalent bacterial population (Fortina *et al.* 2003a; Foschino *et al.* 2006).

Few genetic studies on the species have been published until now. They principally refer to taxonomic identification based on DNA/DNA hybridization studies (Eldar *et al.* 1996), specific PCR assay (Zlotkin *et al.* 1998) and ARDRA (amplified rRNA gene restriction analysis) (Michel *et al.* 2007). Other techniques, such as ribotyping (Eldar *et al.* 1999), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) (Vela *et al.* 2000) and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Analysis) (Ravelo *et al.* 2003) have been used for molecular fingerprinting of fish-pathogenic *L. garvieae* strains; no data on typing of *L. garvieae* strains of dairy origin are available.

In this context, the attention should be addressed to the study of genes codifying important technological properties and factors normally related to virulence. Unfortunately, for this species the genomic databases are not of assistance, as nucleotide sequences of genes other than 16S rDNA are rare.

In a previous study (Fortina *et al.* 2007) we physiologically characterized *L. garvieae* strains representing a relevant component of the microbial population of two artisanal Italian cheeses, in comparison with clinical isolates from animal origin. The results obtained showed that it was possible to discriminate the strains according to the ecological niche of origin. This discrimination concerns a phenotypic character that could be correlated to the adaptation ability of strains to a specific habitat: the lactose utilization. This property, only present in dairy isolates, also reflects the inability of the fish isolates, Lac<sup>-</sup>, to produce significant amount of lactic acid.

This presented a challenge to us to attempt to locate and to characterize some *L. garvieae* genes, by focalizing our attention on genes of the catabolic pathway of lactose.

Within lactic acid bacteria (LAB), several genes involved in the transport and metabolism of lactose have been characterized (de Vos and Vaughan 1994; Grossiord *et al.* 1998). They refer to lactose uptake and hydrolysis *via* a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PEP-PTS) combined with phospho- $\beta$ -galactosidase and/or *via* a lactose permease system in which a  $\beta$ -galactosidase catalyzes sugar cleavage. In many cases the genes involved in lactose metabolism have been found to be linked to genes involved in galactose degradation, codifying for a galactose permease and the enzymes of the Leloir pathway, galactokinase (GalK), galactose-1-phosphate uridyl-transferase (GalT) and UDP-glucose 4-epimerase (GalE) (Vaughan *et al.* 2001; Fortina *et al.* 2003b).

By employing several degenerate primers and by constructing different vectorette libraries we identified the genes encoding the *L. garvieae* galactose permease, and phospho- $\beta$ -galactosidase. Here we describe the nucleotide sequences of these genes and their surrounding regions and provide evidence that the presence of the phospho- $\beta$ -galactosidase gene can be used as a valid genetic marker for distinguishing dairy *L. garvieae* strains from fish isolates.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and culture conditions

The *L. garvieae* strains used in this study include the type strain DSM 20684<sup>T</sup>, 32 strains collected from the manufacture of the artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, Toma Piemontese (Fortina *et al.* 2007) and 12 fish isolates, collected from 1999 to 2004 from diseased rainbow trouts and catfish, kindly provided by Dr Prearo (Experimental Institute for Zooprophyllaxis, Torino, Italy) and by Dr. Amedeo Manfrin (Venetian Experimental Institute for Zooprophyllaxis, National Reference Lab. for Fish Diseases, Legnaro, Italy). *L. lactis* DSM 20481<sup>T</sup> was also used for dot blot hybridization experiments. All strains, stored frozen in broth cultures supplemented with 15% (w/v) glycerol, were grown in M17 broth (Difco, Detroit, Mich., USA) supplemented with 5 g l<sup>-1</sup> glucose at 37 °C for 24 h.

### DNA isolation and manipulation

Chromosomal DNA was extracted as previously described (Fortina *et al.* 2003a). Restriction endonucleases and other enzymes employed for DNA manipulation were purchased from MBI-Fermentas (Vilnius, Lithuania) and used according to the supplier's specifications.

For the PCR, 100 µl of an overnight culture in M17 broth was added to 300 µl of 1x TE buffer (10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8), and the DNA was extracted as previously described.

### Selection of primers

On the basis of conserved regions identified by sequence comparison of the β-galactosidase, lactose permease and phospho-β-galactosidase genes from *Lactococcus lactis* (GenBank accession numbers U60828 and M19454), *Streptococcus pneumoniae* (AE008480), *Strept.*

6. Sicurezza d'uso e tipizzazione di *Lactococcus garvieae* in prodotti caseari italiani CP000024), *Pediococcus pentosaceus* (Z32771), *Leuconostoc lactis* (U47655), *Lactobacillus helveticus* (AJ512877), *Lact. acidophilus* (AB004867) and *Escherichia coli* (J01636), a set of degenerate oligonucleotides were designed and used for PCR amplification of *L. garvieae* genes. The primers were designed so that most of the nucleotide similarity was at the 3' end. All the primers were obtained from PRIMM srl (Milan, Italy).

### **The vectorette library**

To amplify the DNA sequences lying outside the boundaries of the known sequences we constructed 2 vectorette libraries. A vectorette is a special adapter, a partly double-stranded DNA that has a central mismatched region and sticky ends (Riley *et al.* 1990). In this study we used the oligos V1 and V3 and the primer pV1 (Eggert *et al.* 1998), with modification of the ends to create *Cfo* I or *Hpa* II sticky overhang. About 100 ng of bacterial DNA was digested with *Cfo* I or *Hpa* II, then ligated to 100 ng of vectorette with 6U of T4 DNA ligase in 20  $\mu$ l for 4 h at 22°C. After heating for 10 min at 65°C, the DNA was precipitated with ethanol and dissolved in 20  $\mu$ l *Cfo* I or *Hpa* II buffers. The respective restriction enzyme was added, then the reaction was incubated for 60 min at 37°C and heated for 10 min at 65°C. The resulting mixture was a vectorette library. The end of the oligo V3 has a mismatch, as after ligation with the respective fragments of chromosomal DNA, the sequence does not correspond to the normal restriction enzyme site and will be refractory to cleavage. All other multimer forms (having the normal restriction enzyme site) will be destroyed. In this way, all artefacts consecutive to the insertion of other fragments between vectorette and the fragment known could be excluded. For the PCR reactions, 1  $\mu$ l of vectorette library served as a template.

### **DNA amplification procedure**

Each 25- $\mu$ l reaction mixture contained 100 ng bacterial DNA, 2.5  $\mu$ l of 10x reaction buffer, 200  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> of each dNTP, 2.5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> of each primer, and 0.5 U *Taq*

polymerase (MBI-Fermentas). All the amplification reactions were performed using a Gene Amp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). The initial denaturation step at 94°C for 2 min was followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s and annealing at 58°C for 1 min with extension at 72°C for 2 min. The final cycle was followed by an additional 7 min elongation period at 72°C. Amplification products were separated on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide in 1x TAE buffer (40 mmol l<sup>-1</sup> Tris-acetate, 1 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8) and photographed in UV light.

### **Dot blot hybridization**

For dot blot hybridization, approximately 1 µg of bacterial genomic DNA of each strain was spotted onto a nylon membrane (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) according to the manufacturer's directions. The DIG DNA Labelling and Detection kit (Roche) was used for digoxigenin labelling of the 1078 and 1240-bp fragments of the *L. lactis* β-galactosidase and *L. garvieae* phospho-β-galactosidase genes, respectively. Prehybridization and hybridization overnight were performed in 50% (w/v) formamide at 42°C and stringency washes in 0.1x SSC at 65°C (10x SSC buffer contains 1.5 mol l<sup>-1</sup> NaCl and 150 mmol l<sup>-1</sup> sodium citrate). The probe was detected by chemiluminescent detection using CSPD (Roche) and the signals were visualized by exposure to X-ray film for 1 h.

### **Nucleotide sequencing**

The amplified products obtained by PCR were visualized by agarose gel electrophoresis and excised from the gel using a NucleoSpin Extract extraction kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany). The DNA sequences were determined using the dideoxy chain termination principle (Sanger *et al.* 1977) with an ABI Prism Big Dye terminator kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on ABI Prism310 DNA sequencer.

### **Database search and sequence comparison**

The database searches were performed by using the basic local alignment tool (BLAST) programs (Altschul *et al.* 1990; Altschul *et al.* 1997) from the National Center for Biotechnology Information BLAST website. Multiple-sequence alignments were constructed by using DNASIS software (Hitachi Software Engineering Co. Ltd.).

### **Nucleotide sequence accession numbers**

The nucleotide sequences described here have been deposited in the GenBank database under accession numbers EU153555 and EU153556.

### **$\beta$ -Galactosidase assays**

The assays was carried out as previously reported (Ricci and Fortina 2006), resuspending *L. garvieae* cells in distilled water containing 0.1% Triton X-100 and using *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG-Sigma, St Louis, Mo, USA) as substrate. Alternatively,  $\beta$ -galactosidase activity was detected by plating the strains on M-17 medium containing 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside; Sigma).

## **RESULTS**

### ***L. garvieae* gal operon**

Existing information about the sequence of the lactose genes in *L. lactis* and other LAB and not LAB species was used to locate and characterize the corresponding *L. garvieae* genes. On the basis of the conserved regions identified by sequence comparison of lactose permease genes, a set of degenerate primers was designed and used for PCR amplification of *L. garvieae* strains.

Amplicons of the expected 520 bp size, by using primers PermF5 5'-

TGGGGAAAATTTAAACCTTGG-3' and Perm R6 5'-TGCCCATAGCAACTGATCATT-3'

were obtained for all strains, indicating the presence of such a gene in either Lac<sup>+</sup> or Lac<sup>-</sup> isolates. Comparison of the deduced amino acid sequence with the sequences available in databases showed that there was significant homology between this incomplete sequence and several galactose and lactose permease sequences.

Subsequently, we designed several set of degenerate primers for the partial amplification of the  $\beta$ -galactosidase gene in *L. garvieae*. For all strains and for all primers employed, PCR experiments did not yield any amplification product. To confirm these results, a dot-blot hybridization analysis was carried out, employing a  $\beta$ -galactosidase gene probe obtained from the amplification product of the *L. lactis* DSM 20481<sup>T</sup> strain (primer set F1 5'-GAAGATCAAGATATGTGG-3'; R1 5'-CTTGATCCACCCAGTCCCA-3'). No hybridization signals were detected. A  $\beta$ -galactosidase assay was also performed on permeabilized cells by measuring the rate of hydrolysis of ONPG and by investigating the growth on M17 agar plates containing X-Gal. In both cases no  $\beta$ -galactosidase activity was detected, according to the presumptive absence of the  $\beta$ -galactosidase gene.

For the type strain of the species we extended sequence analysis of the amplicon containing part of the permease gene and its flanking regions, by using a vectorette library, as above specified. In this way, a 1330 bp upstream and a 5940 bp downstream regions of the partial permease gene have been sequenced. Computer analysis revealed the presence of a gene cluster containing five complete open reading frames (ORFs), oriented in the same direction, which are designated here based on their homology to previously characterized genes (Fig.1). The first ORF, named *galP*, was a 1401 bp gene encoding a galactose permease. At 51 bp downstream from *galP*, was a 1029 bp *galM* gene encoding a galactose mutarotase. Downstream of *galM*, separated by 10 bp, was a 1200 bp galactokinase gene (*galK*), and this was followed, at 11 bp, by an ORF (*galT*, 1485 bp long) encoding a galactose-1-phosphate uridylyltransferase. The last 990 bp ORF started 71 bp from the end of the *galT* gene. This *galE*

gene encoded an UDP-glucose 4-epimerase. The following 450 bp sequenced did not show other ORFs.

Comparison of the deduced amino acid sequences with the sequences available in the databases showed that there was significant homology with previously described sequences of the proteins required for transport and utilization of galactose via the Leloir pathway ( Poolman *et al.* 1990-1996; Bettenbrock and Alpert 1998; Bolotin *et al.* 2001; Vaughan *et al.* 2001). Particularly, in *L. garvieae* the enzymes of the Leloir pathway showed the greatest predicted similarities and the same gene order to the enzymes identified in *L. lactis* subsp. *cremoris* (Grossiord *et al.* 2003). This gene cluster was present in all strains tested.

Upstream *galP* we found another ORF, named ORF x, oriented in the same direction, 735bp long and encoding a protein showing similarity to several transcriptional regulators of *Lactococcus lactis* (AE006429; ABJ73703).

### **Finding and distribution of the phospho- $\beta$ -galactosidase gene in *L. garvieae***

On the basis of conserved regions identified by sequence comparison of the phospho- $\beta$ -galactosidase genes from different LAB and not LAB species, a set of degenerate primers was designed and used for PCR amplification of the corresponding *L. garvieae* phospho- $\beta$ -galactosidase gene.

For *L. garvieae* strains of dairy origin a PCR with primers Ph- $\beta$ -gal F1 5'-GCTACAGCTGCTTATCAAGC-3' and Ph- $\beta$ -gal R1 5'-GAAAACGTCCATNAGNGACCA-3' gave a 1240 bp product of expected size. This amplified partial product showed a surprisingly very high identity (>99%) with the phospho- $\beta$ -galactosidase gene of *Lactococcus lactis* (M19454).

*L. garvieae* DSM 20684<sup>T</sup> and the 12 fish isolates did not yield any amplification product.

This interesting result has been confirmed by a dot-blot hybridization experiment, employing a phospho- $\beta$ -galactosidase probe obtained from the amplification product of a *L.*

*garvieae* strain of dairy origin. The probe hybridized exclusively with DNA derived from strains of dairy origin ( Fig. 2 ). The tested fish isolates did not show any hybridization signal.

By using another vectorette library, we carried out a preliminary sequencing study 1700 bp upstream of the partial phospho- $\beta$ -galactosidase gene. Computer analysis revealed the presence of two ORFs, oriented in the same direction. The first ORF, named *lacE*, was 1612 bp long and encoded a 536 amino acid protein showing 98% sequence identity with enzyme II of *Lactococcus lactis* (M60447); 139 bp downstream, we found the second ORF, *lacG*, 1263 bp long, encoding the phospho- $\beta$ -galactosidase. These genes and this organization were found in all dairy origin strains. In lactococci, *lacE* gene product represents one of the two lactose specific components, a membrane-located and a soluble enzyme correlated to the phosphotransferase system encoded by a lactose-inducible operon with the gene order, *lacF*, *lacE*, *lacG* (de Vos *et al.* 1990; de Vos and Vaughan 1994).

## DISCUSSION

With this study we contribute to the characterization of *Lactococcus garvieae* strains associated with artisanal cheeses from Italy. In our previous studies, this species was shown to represent a relevant component of the autochthonous bacterial population in different Italian cheeses (Fortina *et al.* 2003a); in these products *L. garvieae* explains its role with a slow rate of acidification and a moderate proteolytic activity. As the tested strains did not possess high virulence profiles (Fortina *et al.* 2007), their use in artisanal cheeses may be pursued as a low risk is involved.

On the contrary, *L. garvieae* is considered an emerging pathogen of increasing clinical significance in the field of fish farming.

For these reasons, the possibility to discriminate *L. garvieae* strains on the basis of the specific ecological niche of origin is of great practical interest.

Previous studies (Fortina *et al.* 2007) have shown that the ability to acidify lactose could be considered a phenotypic trait useful as epidemiological marker for distinguishing Lac<sup>+</sup> dairy strains from Lac<sup>-</sup> fish isolates. In this present work, we carried out genotypic studies to verify the phenotypic diversity previously found, with the aim to obtain a more stable and reliable genotypic marker.

We focalized our search on the genes of the catabolic pathway of lactose. By employing degenerate primers and by constructing different vectorette libraries, we identified several genes related to galactose and lactose utilization in *L. garvieae*; this molecular approach permitted us to obtain novel information on this species.

In the first place, *L. garvieae* seems to have a single system for the catabolism of lactose, characterized by the presence of a lactose transport and hydrolysis depending on a phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system combined with a phospho- $\beta$ -galactosidase.

The second remark is the observation that this system, bioenergetically efficient, as the sugar is translocated and phosphorylated in a single step (de Vos *et al.* 1994), was present only in *L. garvieae* strains of dairy origin and lacked in fish isolates. This important diversity can explain the lactose-fermenting inability (Lac<sup>-</sup> phenotype) of fish strains previously found, and can be really exploited as a genetic marker for distinguishing biotypes from the two different ecological niches, through a simple PCR amplification.

The high nucleotide sequence conservation found between *L. garvieae* *lacE* and *lacG* and the corresponding *L. lactis* genes, suggests a possible horizontal *lac* genes transfer between these lactic acid bacteria. Horizontal gene transfer of *lac* genes among unrelated LAB is known and the finding that in some cases these genes are located on conjugative plasmids or are adjacent to IS elements, strongly indicate possible mechanisms involved in their dissemination (Yu *et al.* 1995; Bourgoin *et al.* 1998; Callanan *et al.* 2005). In addition, this possible acquisition could reflect a recent adaptation of *L. garvieae* strains to the dairy

environment where the strains were subjected to high selective pressure for the utilization of lactose, the unique sugar found in milk.

Finally, we found in all *L. garvieae* strains studied a system for galactose utilization consisting of a galactose permease and the Leloir pathway enzymes. The *L. garvieae* modular organization and nucleotide sequence of the genes involved were similar to the *gal* operon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. This last microorganism shows a different organization, compared to the other described *gal* clusters in lactococci (Grossiord *et al.* 2003). Firstly, the gene encoding galactose transport (*galP*) is located within the *galK*, *galT*, *galE* and *galM* cluster, and not elsewhere. Another remarkable feature is that in *L. lactis* subsp. *cremoris* and in *L. garvieae*, this *gal* gene cluster does not consist of a combination of *lac* and *gal* genes, as in many other lactococci; this appears to be more specific for galactose, containing all the structural genes needed for galactose utilization in an uninterrupted form at the same locus.

In conclusion, this is one of the first reports concerning the determination of nucleotide sequence of genes, other than the 16S rDNA gene, in this species. Moreover, we provide information regarding the way of lactose and galactose utilization in *L. garvieae*, and a reliable genetic marker for distinguishing dairy and fish isolates.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support of Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) (PRIN 2004) is gratefully acknowledged. We also thank Dr Marino Prearo and Dr. Amedeo Manfrin, for kindly supplying some *L. garvieae* strains.

## REFERENCES

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Altschul, S. F., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Bettenbrock, K. And Alpert, C.-A. (1998) The *gal* genes for the Leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2013-2019.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D. and Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**, 731-753.
- Bourgoin, F., Guédon, G., Gintz, B. and Decaris, B. (1998) Characterization of a novel insertion sequence, IS1194, in *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid* **40**, 44-49.
- Callanan, M.J., Beresford, T.P. and Ross, R.P. (2005) Genetic diversity in the lactose operon of *Lactobacillus helveticus* strains and its relationship to the role of these strains as commercial starter cultures. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1655-1658.
- de Vos, W. M. and Vaughan, E.E. (1994) Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. *FEMS Micr Rev* **15**, 217-237.

- de Vos, W.M., Boerrigter, I., van Rooyen, R.J., Reiche, B. and Hengstenberg, W. (1990) Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotransferase system in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **265**, 22554-22560.
- Eggert, H., Bergemann, K. and Saumweber, H. (1998) Molecular screening for P-element insertion in a large genomic region of *Drosophila melanogaster* using polymerase chain reaction mediated by the vectorette. *Genetics* **149**, 1427-1434.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bozzetta, E., Goria, M., Prearo, M. and Bercovier, H. (1996) *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of septicaemia and meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol* **32**, 85-88.
- Eldar, A., Goria, M., Ghittino, C., Zlotkin, A. and Bercovier H. (1999) Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in Europe, Asia, and Australia. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1005-1008.
- Eyngor, M., Zlotkin, A., Ghittino, C., Prearo M., Douet, D-G., Chilmonczyk, S. and Eldar, A. (2004) Clonality and diversity of the fish pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean countries. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5132-5137.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. and Manachini, P.L. (2003a) Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma Piemontese. *Food Microbiol* **20**, 397-404.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Foschino, R., Picozzi, C., Dolci, P., Zeppa, G., Cocolin, L. and Manachini, P.L. (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains from dairy environments. *J Appl Microbiol* **103**, 445-453.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Mora, D., Guglielmetti, S. and Manachini, P.L. (2003b) Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3228-3243.

- Foschino R., Picozzi C., Borghi, M., Cerliani, M.C. and Cresci, E. (2006) Investigation on the microflora of Caprino lombardo cheese from raw goat milk. *Ital J Food Sci* **18**, 33-49.
- Furushita, M., Shiba, T., Maeda, T., Yahata, M., Kaneoka, A., Takahashi, Y., Torii, K., Hasegawa, T. *et al.* (2003) Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5336-5342.
- Grossiord, B., Vaughan, E.E., Luesink, E. and De Vos, W.M. (1998) Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Lait* **78**, 77-84.
- Grossiord, B.P., Luesink E.J., Vaughan E.E., Arnaud A. and de Vos W.M. (2003) Characterization, expression, and mutation of the *Lactococcus lactis galPMKTE* genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. *J Bacteriol* **185**, 870-878.
- Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H. and Suzuki, S. (2006) Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *J Appl Microbiol* **101**, 496-504.
- Michel, C., Pelletier, C., Boussaha, M., Douet, D.-G., Lautraite, A. and Tailliez, P. (2007) Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2947-2955.
- Ooyama, T., Hirokawa, Y., Minami, T., Yasuda, H., Nakai, T., Ruangpan, L. and Yoshida, T. (2002) Cell-surface properties of *Lactococcus garvieae* strains and their immunogenicity in the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Org* **51**, 169-177.
- Poolman, B., Knol, J., van der Does, C., Henderson, P.J.F., Liang, W.J., Leblanc, G., Pourcher, T. And Mus-Veteau, I. (1996) Cation and sugar selectivity determinants in a novel family of transport proteins. *Mol Microbiol* **19**, 911-922.

- Poolman, B., Royer, T.J., Mainzer, S.E. and Schmidt, B.F. (1990) Carbohydrate utilization in *Streptococcus thermophilus*: characterization of the genes for aldose 1-epimerase (mutarotase) and UDP glucose 4-epimerase. *J Bacteriol* **172**, 4037-4047.
- Prodromou, K., Thasitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001) Microbiology of "Orinotyri", a ewe's milk cheese from the Greek mountains. *Food Microbiol* **18**, 319-328.
- Ravelo, C., Magariños, B., López-Romalde, S., Toranzo, A. E. and Romalde, J. L. (2003) Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* **41**, 751-756.
- Ricci, G. and Fortina, M.G. (2006). Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from cheeses by distribution studies of insertion sequences. *Int J Food Microbiol* **112**, 112-119.
- Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finnier, R., Jenner, D., Powell, S., Anand, R., Smith, J.C. and Markham, A.F. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res* **18**, 2887-2890.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Teixeira, L. M., Merquior, V.L.C., Vianni, M.C.E., Carvalho, M.G.S., Fracalanizza, S.E.L., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. and Facklam, R.R. (1996) Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 664-668.
- Vaughan, E.E., Pridmore, R.D., and Mollet, B. (1998) Transcriptional regulation and evolution of lactose genes in the galactose-lactose operon of *Lactococcus lactis* NCDO2054. *J Bact* **180**, 4893-4902.

- Vaughan, E.E., van den Bogaard, P.T.C., Catzeddu, P., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. (2001) Activation of silent *gal* genes in the *lac-gal* regulon of *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **183**, 1184-1194.
- Vela, A.L., Vázquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A., Liébana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Domínguez, L. and Fernández-Gayazábal, J.F. (2000) Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *J Clin Microbiol* **38**, 3791-3795.
- Yoshida, T., Endo, M., Sakai, M. and Inglis, V. (1997) A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Organ* **29**, 233-235.
- Yu, W., Mierau, I., Mars, A., Johnson, E., Dunny, G. And McKay, L.L. (1995) Novel insertion sequence-like element IS982 in lactococci. *Plasmid* **33**, 218-225.
- Zlotkin, A., Eldar A., Ghittino C., and Bercovier, H. (1998) Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *J Clin Microbiol* **36**, 983-985.

### Figure legends

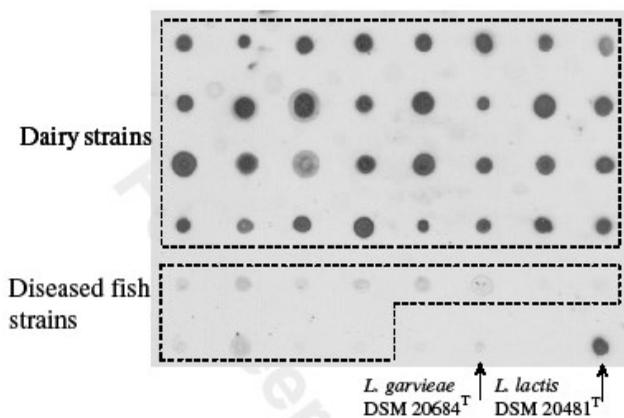
**Figure 1** Arrangement of the *gal* gene cluster of *Lactococcus garvieae* DSM 20684<sup>T</sup> (accession number EU153555)

**Figure 2** Dot blot hybridization with different *Lactococcus garvieae* strains and *L. lactis* strain DSM 20481<sup>T</sup>, using the *lacG* (phospho- $\beta$ -galactosidase gene) fragment probe.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



## **Bibliografia**

**Charpentier E. and Courvalin P.** (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrobiol Agents Chemot, **43**: 2103-2108.

**Collins M.D., Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. and Williams A.M.** (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. J Appl Bacteriol, **67**: 453-460.

**Corroler D., Desmasures N. and Guèguen M.** (1999). Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. Appl Microbiol Biotech, **51**: 91-99.

**de Vos W.M. and Vaughan E.E.** (1994). Genetics of lactose utilization in lactic acid bacteria. FEMS Micr Rev, **15**: 217-237.

**Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M. and Beresford T.P.** (2000). A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. Syst Appl Microbiol, **23**: 510-522.

**Eldar A., Gorla M., Ghittino C., Zlotkin A. and Bercovier H.** (1999). Biodiversity of *Lactococcus garvieae* strain isolated from fish in Europe, Asia and Australia. Appl Environ Microbiol, **65**: 1005-1008.

**Eyngor M., Zlotkin A., Ghittino C., Prearo M., Douet D., Chilmonczyk S. and Eldar A.** (2004). Clonality and diversity of the fish pathogen

*Lactococcus garvieae* in mediterranean countries. Appl Environm Microbiol, **70**: 5132-5137.

**Food Micro, The 20<sup>th</sup> International ICFMH Symposium** (August 29-September 2, 2006). Food safety and food biotechnology: diversity and global impact. Bologna, Italy, 269.

**Fortina M.G. , Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A. and Manachini P.L.** (2003a). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma Piemontese. Food Microbiol, **20**: 397-404.

**Fortina M.G. , Ricci G., Mora D., Guglielmetti S. and Manachini P.L.** (2003b). Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. Appl Environ Microbiol, **69**: 3228-3243.

**Fortina M.G., Ricci G., Foschino R., Picozzi C., Dolci P., Zeppa G., Cocolin L. and Manachini P.L.** (2007). Phenotypic typing, technological properties and safety aspects of *Lactococcus garvieae* strains isolated from dairy environments. J Appl Microbiol, **103**: 445-453.

**Foschino R., Picozzi, C., Borghi M., Cerliani M.C. and Cresci E.** (2006). Investigation on the microflora of Caprino Lombardo cheese from raw goat milk. Ital J Food Sci, **18**: 33-50.

**Garde S., Babin M., Gaya P., Nuñez M. and Medina M.** (1999). PCR amplification of the gene *acmA* differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*. Appl Environm Microbiol, **65**: 5151-5153.

**Garvie E.I., Farrow J.A.E. and Phillips B.A.** (1981). A taxonomic study of some strains of streptococci which grow at 10°C but not at 45°C including

*Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Nat Inst Res Dairy, **2**: 151-165.

**Grossiord B.P., Luesink E.J., Vaughan E.E., Arnaud A. and De Vos W.M.** (2003). Characterization, expression, and mutation of the *Lactococcus lactis* galPMKTE genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. J Bacteriol, **185**: 870-878.

**Grossiord B.P., Vaughan E.E., Luesink E. and de Vos W.M.** (1998). Genetics of galactose utilization via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. Lait, **78**: 77-84.

**Kusuda R., Kawai R., Salati F., Banner C.R. and Fryer J.L.** (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. Int J Syst Bacteriol, **41**: 406-409.

**Mangin I., Corroler D., Reinhardt A. and Guèguen M.** (1999). Genetic diversity among dairy lactococcal strains investigated by polymerase chain reaction with three arbitrary primers. J Appl Microbiol, **86**: 514-520.

**Ravelo C., Magarinos B., Romalde L.S., Toranzo A. and Romaldo J.L.** (2003). Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J Clin Microbiol, **41**: 751-756.

**Sandine W.E.** (1985). New nomenclature of non-rod-shaped lactic acid bacteria. Biochim, **70**: 519-522.

**Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilper-Balz R., Collins M.D. and Fischer W.** (1988). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst Appl Microbiol, **6**: 183-195.

**Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.G.** (1996). Genus *Streptococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD USA, **2**: 1043-1068.

**Stackebrandt E. and Goebel B.M.** (1994). Taxonomic note: a place for DNA/DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. In J Syst Bacteriol, **44**: 846-849.

**Stackebrandt E. and Teuber M.** (1985). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. Biochim, **70**: 317-324.

**Turner N., Sandine W.E., Elliker P.R. and Day E.A.** (1963). Use of tetracycline dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. J Dairy Sci, **46**: 380-385.

**Vaughan E.E., Pridmore R.D. and Mollet B.** (1998). Transcriptional regulation and evolution of lactose genes in the galactose-lactose operon of *Lactococcus lactis* NCDO2054. J Bact, **180**: 4893-4902.

# 7. Conclusioni

La ricerca effettuata nell'ambito del progetto del Dottorato di Ricerca in Biotecnologie degli Alimenti ha permesso di acquisire più approfondite conoscenze su *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus italicus* e *Lactococcus garvieae*, focalizzando l'attenzione direttamente sul genoma batterico di queste specie, non ancora del tutto studiato.

L'approccio intrapreso per il raggiungimento degli obiettivi prefissati è stato uno studio di tipo polifasico, volto a verificare che gli ecotipi delle specie in studio, provenienti dal settore caseario possano aver seguito una linea evolutiva differente come conseguenza di un loro adattamento specifico ad una ben definita nicchia ecologica, il latte. Tale studio risulta d'importanza per dimostrare la salubrità di questi ecotipi caseari.

Per tale motivo lo studio è stato condotto attraverso la ricerca e il sequenziamento sia di *loci* genici conservati, considerati in termini evolutivi "orologi genetici" sia di particolari "cassette geniche" codificanti caratteristiche biotecnologiche di interesse e eventuali fattori legati alla virulenza. A questo sono stati affiancati studi riguardanti la capacità di trasferimento genico orizzontale, attraverso processi di coniugazione batterica, mediati da plasmidi di tipo coniugativo e studi relativi ad ottenere marker genetici in grado di rilevare in modo rapido e preciso gli ecotipi in esame, all'interno delle matrici alimentari.

I prodotti della ricerca possono essere così di seguito elencati:

- ✓ Allestimento di un collezione significativa di ecotipi di *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus italicus* e *Lactococcus garvieae* di origine casearia.
- ✓ Tipizzazione molecolare dei ceppi studiati in funzione della nicchia ecologica di provenienza attraverso metodiche quali ARDRA e MLRT.
- ✓ Individuazione di sonde specie-specifiche e marker genici per la rivelazione e la discriminazione di *Enterococcus italicus* e *Lactococcus garvieae*.
- ✓ Sequenziamento di regioni discrete del genoma degli ecotipi allo studio con individuazione di discriminanti genici codificanti caratteristiche biotecnologiche e fattori di virulenza, non ancora studiati.
- ✓ Ottenimento del profilo plasmidico e caratterizzazione molecolare delle diverse molecole di DNA extracromosomale.
- ✓ Messa a punto di esperimenti di coniugazione batterica e valutazione della capacità di trasferimento genico orizzontale nella nuova specie *Enterococcus italicus*.

Tali risultati sono stati riuniti nelle seguenti:

### **Pubblicazioni**

- Ricci G., **Borgo F.** and Fortina M.G. (2006). Plasmids from *Lactobacillus helveticus* : distribution and diversity among natural isolates. Lett Appl Microbiol: 88, 241-245.

- **Borgo F.**, Ricci G., Manachini P.L. and Fortina M.G. (2007). Multilocus restriction typing: a tool for studying molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* of dairy origin. *Int Dairy J*: 17, 336-342.
- Fortina MG., Ricci G., **Borgo F.** and Manachini P.L. (2007). Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. *Lett Appl Microbiol*: 44, 443-446.
- Fortina MG., Ricci G., **Borgo F.** ,Manachini P.L., Arends K., Schiwon K., Abajy M.Y. and Grohmann E. (2007). A survey on biotechnological potential and safety of the novel species of dairy origin, *E. italicus*. Accepted for publication in *Int J Food Microbiol*.
- **Borgo F.** , Ricci G., Arends K., Schiwon K., Grohmann E. and Fortina M.G. (2007) *Enterococcus italicus*: plasmid distribution and potential of tetracycline resistance conjugal transfer. Submitted to *Int Dairy J*.
- Ricci G., **Borgo F.**, Manachini P.L and Fortina M.G. (2007). The study of lactose and galactose gene clusters in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing biotypes from different ecological niches. Submitted to *Int Dairy J*.

**Poster**

- Fortina M.G, Borgi M., **Borgo F.**, Bottero M.T., Civera T., Cocolin L., Dolci P., Foschino R., Iacumin L., Picozzi C., Ricci G., Manachini P.L. and Zeppa G. (2006). Detection and typing of *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus xylosus* characterizing natural fermentations of Italian dairy products and sauges. Food Micro, The 20<sup>th</sup> International ICFMH Symposium. Food safety and food biotechnology: diversity and global impact. Bologna, Italy, 269.
- **Borgo F.**, Ricci M.G. and Manachini P.L. (2007). Genotypic typing of bacterial ecotypes significantly present in natural fermentation of Italian dairy products. Metodologie di genotipizzazione e

diagnostica molecolare per il settore agroalimentare, Parco Tecnologico Padano, Lodi, Italy.