

Biodiversità batterica in lattici destinati alla produzione di formaggi nostrani trentini

Franciosi E., Schiavon S., Poznanski E., Cavazza A.

Unità Operativa Tecnologie Alimentari e Microbiologia, Istituto Agrario di San Michele all'Adige (TN)

Riassunto

La presentazione sul mercato di prodotti che vantano peculiarità tipizzanti fortemente legate al territorio - come è nel caso dei prodotti a DOP e IGP o di provenienza da areali "di montagna" o comunque geograficamente definiti - richiede di comprovare tali peculiarità. In particolare, coerentemente con i regolamenti europei, è necessaria la dimostrazione dell'irripetibilità di quel prodotto in altra zona. Anche la distribuzione delle popolazioni microbiche è legata alle caratteristiche ambientali, e potrebbe essere utilizzata come parametro che caratterizza le materie prime provenienti da areali definiti. Oggetto del nostro studio sono state cinque tipologie di "Nostrano" prodotti in Trentino, formaggi a pasta semidura ottenuti da latte crudo, che costituiscono una porzione cospicua (il 30%) dell'intera produzione provinciale. Le cinque tipologie di prodotto - Puzzone di Moena, Sprezza delle Giudicarie, Vezzena, Nostrano di Primiero, Nostrano della Val di Sole - vengono caseificate con latte proveniente da areali differenti e ben circoscritti nella Provincia di Trento, rientrano tra i prodotti tradizionali, e per alcuni di essi è stata avviata la procedura per ottenere la DOP. Tutte le produzioni estive sono fatte con latte d'alpeggio, ad eccezione della Sprezza e del Nostrano della Val di Non. Nell'ambito di uno studio che mira ad individuare il legame dei prodotti lattiero-caseari con il territorio di produzione, si è studiata la distribuzione delle popolazioni microbiche residenti nelle partite di latte destinate alla produzione di formaggi tipici, e raccolte nei periodi estivo ed invernale. In particolare, sono stati raccolti campioni di latte di stalla, destinato a lavorazioni "invernali" e di latte d'alpeggio per quelle "estive". La composizione microbica dei lattici prodotti in areali diversi è risultata piuttosto eterogenea sia per quanto riguarda la carica microbica totale, che per la composizione di tale carica. Differenze sono state rilevate anche nella distribuzione delle popolazioni nelle partite di latte della stessa zona nei periodi estivi ed invernali. Dalle analisi molecolari, finalizzate all'identificazione dei ceppi isolati, è stato possibile descrivere puntualmente la composizione in specie della microflora dei diversi lattici, mettendo in luce il legame tra la zona d'origine del latte e la microflora in esso residente.

Introduzione

Oggetto del nostro studio sono stati i formaggi tipo Nostrano prodotti in provincia di Trento: Sprezza, Nostrano di Val di Sole, Vezzena, Nostrano di Primiero e Puzzone di Moena. Sono tutti formaggi a pasta semidura, ottenuti per cottura della cagliata ad una temperatura di circa 48°C, passaggio in salamoia e stagionatura delle forme per un periodo variabile dai tre agli otto mesi in base alla tipologia. Sono prodotti da latte crudo proveniente sia da mungitura mattutina che serale, miscelati in proporzioni variabili. Nei mesi invernali il latte proviene da vacche allevate in stalla, mentre nei mesi estivi da vacche in alpeggio. Solo la Sprezza è prodotta anche nei mesi estivi con latte di stalla. La lavorazione casearia non avviene in malga, ma nei caseifici sociali situati a fondovalle. La zona di provenienza e di lavorazione del latte per ogni formaggio è: Valli Giudicarie per la Sprezza, Val di Sole per il Nostrano Val di Sole, altopiano di Lavarone per il Vezzena, Val di Fiemme per il Puzzone e valli di Primiero per il Nostrano di Primiero. Questi nostrani rientrano tra i prodotti tradizionali, e per alcuni di essi si sta percorrendo l'iter per il riconoscimento della D.O.P. (Denominazione di Origine Protetta). Affinché un formaggio possa ottenere tale marchio deve soddisfare

parametri ben precisi, quali l'essere legato ad una particolare zona geografica, avere una tecnologia di produzione caratteristica e costante, e possedere caratteri chimici, fisici e microbiologici peculiari. Nei formaggi ottenuti da latte crudo, il contributo che la flora batterica presente nel latte può dare alla definizione delle caratteristiche sensoriali è particolarmente rilevante, ed i microrganismi presenti nel latte prima della caseificazione (soprattutto batteri lattici) sono spesso gli stessi che poi si ritrovano durante la fermentazione e la stagionatura del prodotto (Beresford *et al.*, 2001). La popolazione microbica presente durante queste fasi della maturazione di un formaggio può avere un metabolismo molto attivo e svolgere, tra l'altro, processi lipolitici e proteolitici utili per la formazione di aromi che vanno ad arricchire e definire ulteriormente il sapore di un formaggio (Wouters *et al.*, 2002). Inoltre la microflora indigena del latte può essere considerata un legame tra il formaggio, l'ambiente e l'area geografica di produzione, poiché la contaminazione del latte avviene fra il momento della mungitura e quello della lavorazione, e può esserci dunque una correlazione tra le caratteristiche di un formaggio, la microflora presente nel latte di partenza e la tecnologia di produzione adottata.

Con questo lavoro ci siamo proposti di descrivere la popolazione microbica presente in campioni di latte crudo prelevato al momento della lavorazione dei formaggi in modo da avere un quadro della composizione delle popolazioni microbiche e della loro distribuzione nei latti prelevati da diverse zone e in stagioni diverse dell'anno. Per conseguire tale obiettivo sono stati effettuati 263 isolamenti e i ceppi sono stati caratterizzati con tecniche molecolari; tra questi si sono identificati quelli che rappresentavano la maggioranza della popolazione microbica in ogni campione.

Materiale e metodi

Campionamento del latte

Sono stati raccolti 9 campioni di latte destinati alla lavorazione di formaggi tipo "Nostrano" che provenivano da 5 zone geografiche differenti, ed erano conferiti ai seguenti caseifici sociali: caseificio sociale di Mezzana (Val di Sole), caseificio sociale di Pinzolo (Valli Giudicarie), caseificio sociale di Lavarone (Altopiano di Lavarone), caseificio sociale di Fiera di Primiero (Valli di Primiero) e caseificio sociale di Predazzo (Val di Fiemme). Per ogni tipologia di nostrano, ad eccezione della Spressa, sono stati eseguiti due campionamenti, uno in inverno e uno in estate, in quanto l'alimentazione delle vacche varia secondo la stagione (fieno per gli animali in stalla nella stagione invernale, erba al pascolo per gli animali in alpeggio durante l'estate). La Spressa, come da disciplinare, è prodotta esclusivamente con latte di stalla, pertanto è stato effettuato un unico campionamento di latte.

I campioni di latte sono stati prelevati dalla caldaia al momento della caseificazione, e perciò erano costituiti sia da latte proveniente dalla mungitura della mattina che da latte parzialmente scremato dalla sera precedente, miscelati in proporzioni variabili a seconda della tipologia di formaggio.

I campioni sono stati immediatamente immersi in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento delle analisi.

Conta e isolamento di microrganismi

I terreni utilizzati per la valutazione della carica batterica totale e per l'isolamento dei ceppi sono stati: Agar-latte, per l'enumerazione dei batteri lattici acidofermentanti; MRS per la conta dei lattobacilli, MRS addizionato di Vancomicina per la conta dei lattobacilli eterofermentanti, M17 per la conta delle forme cocciche, KEA (Kanamicina Esculina Agar) per la conta degli enterococchi e BP (Baird-Parker) per la conta degli stafilococchi.

Per il conteggio e l'isolamento delle forme mesofile e termofile i terreni Agar-Latte, MRS, MRS con Vancomicina e M17 sono stati inoculati in duplice serie, ed incubati separatamente a 28°C e a 45°C per 48 ore in anaerobiosi (solo M17 a 28°C è stato incubato in aerobiosi per 24 ore). Le piastre di KEA e BP sono state incubate in aerobiosi a 37°C per 48 ore.

Ogni colonia è stata sottoposta ad analisi macromorfologica e successivamente si è proceduto con il prelievo di 3 colonie a caso per ogni tipologia, le quali sono state in seguito propagate, per l'isolamento, in terreno liquido MRS per le colonie isolate da MRS o MRS addizionato di Vancomicina, e M17 per le colonie isolate da tutti gli altri terreni.

Caratterizzazione fisiologica degli isolati

Tutti gli isolati sono stati sottoposti al test della catalasi per verificare l'appartenenza alla categoria dei batteri lattici. La morfologia cellulare è stata descritta mediante osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase.

Tutti gli isolati sono stati conservati a -80°C in coltura liquida con 20% di glicerolo.

Individuazione dei biotipi tramite RAPD-PCR

Gli isolati risultati negativi al test della catalasi (batteri lattici) sono stati sottoposti ad analisi RAPD-PCR. I profili ottenuti sono stati confrontati tra loro per individuare eventuali gruppi di ceppi considerati omologhi. Ogni pattern elettroforetico unico attribuito ad un gruppo di ceppi ha consentito di individuare un "biotipo" associato a quel gruppo di ceppi. Ciascun biotipo (=gruppo di ceppi accomunati da identico profilo RAPD) presente in porzione maggioritaria nel campione analizzato è stato poi identificato tramite sequenziamento della regione 16S del rDNA.

L'estrazione del DNA genomico è stata eseguita su 1 ml di coltura liquida di ogni isolato, tramite il Kit *InstaGene Matrix* (Bio-rad). Sul DNA genomico è stata eseguita una RAPD-PCR con primer PC1 (Tabella 1) secondo il protocollo riportato da Poznanski *et al.* (in press).

I prodotti di PCR sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% in tampone di corsa TAE 1X ad un voltaggio di 100V. Le bande sono state visualizzate tramite colorazione del gel in una soluzione di Etidio Bromuro (0.5 µg/µl). I profili ottenuti dalle corse elettroforetiche per ogni isolato sono stati confrontati tramite il programma "Diversity Database Fingerprinting Software" (Bio-rad).

Sequenziamento del 16S rDNA

Il DNA estratto da ogni isolato è stato amplificato nella regione 5' del 16S rDNA (Ercolini *et al.*, 2001; Heilig *et al.*, 2002). Sono stati utilizzati i primer P1-P4 (Tabella 1) che danno un prodotto d'amplificazione di circa 650bp (Cocconcelli *et al.*, 1997).

Le PCR sono state condotte in un volume finale di 50 μ l in un termociclatore in PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) secondo il protocollo riportato da Cocconcelli *et al.* (1997).

Il prodotto d'amplificazione è stato controllato su gel d'agarosio al 1% e in seguito purificato tramite *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagene).

Il sequenziamento è stato effettuato su 30 ng del DNA purificato presso il Centro di Ricerche Biotecnologiche dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Milano. Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle presenti sul sito "Ribosomal Database Project II" (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) per l'identificazione della specie. L'identificazione è stata considerata attendibile quando la sequenza dell'isolato presentava una percentuale d'omologia con una sequenza depositata in banca dati superiore al 95%.

Risultati e discussione

Determinazione della carica batterica presente nei diversi campioni di latte

I dati relativi alla crescita della microflora presente nei campioni sui diversi terreni sono riportati in Tabella 2.

Generalmente è stata osservata una prevalenza di forme mesofile, presenti in quantità comprese tra $1,6 \times 10^3$ e $5,8 \times 10^6$ ufc/ml, su quelle termofile. Nel campione di latte della Val di Sole prevalevano le forme termofile ($2,6 \times 10^6$ ufc/ml) così come nel campione proveniente dalla Valle di Primiero ($1,4 \times 10^6$ ufc/ml); nel campione proveniente da stalla dell'altopiano di Lavarone non vi è una chiara dominanza. Dove presenti, le forme termofile erano principalmente rappresentate da ceppi acidofermentanti (conte su Agar-latte a 45°C), tranne che nei campioni di latte prelevati da Val di Fiemme e da stalla di Lavarone (dove erano presenti in quantità uguale o inferiore a 10^3 ufc/ml). Le specie eterofermentanti (MRS + Vancomicina) erano poco presenti, ed in particolare quelle termofile non superavano la carica di 5×10^2 ufc/ml (latte proveniente dalle Giudicarie). Le crescite su KEA hanno mostrato presenza di quantità significative di enterococchi nei campioni di latte d'alpeggio di Val di Fiemme ($2,0 \times 10^4$ ufc/ml), Primiero ($2,4 \times 10^4$ ufc/ml) e di stalla da Val di Sole ($1,6 \times 10^4$ ufc/ml).

La morfologia cellulare di tutte le colonie isolate è stata determinata per osservazione al microscopio. Da questa analisi è emersa una netta prevalenza di forme cocciche su quelle bacillari. Nessuno degli isolati dai campioni di latte prelevati dai caseifici di Mezzana, Pinzolo, Fiera di Primiero (latte da alpeggio) e Predazzo (latte invernale) era costituito da bacilli. Forme bacillari sono state trovate nel campione di latte d'alpeggio proveniente dalla Val di Fiemme (8 isolati su 38), nei campioni di latte provenienti dall'altopiano di Lavarone (10 isolati su 85) e nei campioni di latte provenienti dalla valle di Primiero (10 isolati su 99). In tutti i

campioni le forme bacillari ritrovate rappresentavano una piccola percentuale della popolazione microbica; il contenuto più alto è stato riscontrato nel latte campionato al caseificio di Predazzo dove i lattobacilli non superavano il 2% dell'intera popolazione microbica rilevata. Anche le colonie isolate da MRS si sono rivelate per lo più costituite da cocchi; infatti su MRS, anche se considerato terreno selettivo per lattobacilli, possono crescere anche forme cocciche (Zacchello, 1991).

Analisi RAPD-PCR per individuazione dei biotipi batterici

Successivamente alla conta su piastra, da ogni terreno sono state isolate tre colonie per ogni tipologia descritta. I ceppi sono stati purificati, sottoposti ad estrazione del DNA e analizzati con tecnica RAPD-PCR. Complessivamente sono stati ottenuti 263 profili RAPD, uno per ogni isolato, che sono stati confrontati fra loro per individuare omologie e differenze. Gli isolati che possedevano lo stesso profilo RAPD-PCR sono stati considerati appartenenti allo stesso *biotipo*. Il numero di biotipi unici riscontrati era di 116 su 263 isolati analizzati (Tabella 3).

I 116 differenti profili appartenevano a ceppi isolati da latti provenienti da zone geografiche distinte e prelevati in stagioni diverse. Tale molteplicità di profili RAPD è indice della presenza di una grande ricchezza in specie e ceppi biodiversi nelle comunità microbiche dei latti, che può essere messa in relazione sia con la provenienza geografica dei campioni, sia con il momento del campionamento, e ha consentito di rivelare una diversità stagionale fra le comunità batteriche che si sono sviluppate in campioni provenienti dalla stessa zona.

Un esempio di confronto fra profili RAPD diversi per l'individuazione di biotipi unici è riportato in Fig.1 e Fig. 2, dove sono rappresentati i profili RAPD-PCR relativi a isolati da campioni di latte invernale proveniente da stalle della Val di Fiemme (Fig. 1) e delle Valli Giudicarie (Fig. 2). In ogni pozzetto del gel è stato caricato un prodotto d'amplificazione RAPD ottenuto da un isolato diverso e i biotipi uguali sono stati contrassegnati con una lettera (Fig.1) o con un numero (Fig.2) uguale. Dal confronto tra i profili delle corse di RAPD-PCR delle due figure, si può notare che nella popolazione microbica isolate dal campione di latte da Val di Fiemme sono stati definiti 17 biotipi indicati con lettere da **A** a **S**, mentre gli isolati dal campione dalle Valli Giudicarie sono stati raggruppati in 9 biotipi indicati con numero progressivo da **1** a **9**.

Identificazione delle specie di appartenenza dei diversi biotipi ritrovati nei diversi campioni di latte

L'identificazione della specie dei 116 biotipi ritrovati nei campioni di latte analizzati è stata effettuata tramite sequenziamento della regione al 5' del 16S rDNA.

Diciannove dei 116 biotipi individuati, non sono stati sequenziati, in quanto l'amplificazione con primer P1-P4 della zona di 16S da sequenziare ha dato esito negativo. Due di questi 19 biotipi coprivano il 35% circa della popolazione microbica ritrovata nel campione di latte proveniente da stalla dell'altopiano di Lavarone. Tra gli isolati che presentavano profili RAPD-PCR diversi, molti si sono rivelati appartenere alla stessa specie, a conferma dell'alto potere discriminante del protocollo di amplificazione adottato, sia a livello di specie che a livello di ceppo

(Poznanski *et al.*, in press). Gli esiti delle identificazioni sono riportati in Tabella 4. Nella colonna di sinistra sono riportati la zona e la stagione di provenienza dei campioni di latte, e il numero totale di biotipi trovati per campione; nella colonna centrale è indicato il risultato dell'identificazione ottenuto mediante sequenziamento, con il numero di biotipi per ogni specie, e nella colonna di destra sono riportate le percentuali di presenza di ciascuna specie calcolate sul totale della carica microbica.

Si è osservato come in tutti i campioni analizzati la maggior parte delle colonie isolate fosse rappresentata da cocchi, appartenenti principalmente alle specie *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus*.

Lactococcus lactis ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* occupavano un posto di riguardo fra le specie predominanti a livello numerico nella maggior parte dei campioni di latte analizzati. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* era presente in quantità pari al 7% in latte del Primiero (percentuale considerata sul totale della carica microbica rilevata), al 35% in latte d'alpeggio di Val di Fiemme, all'8% in latte di stalla e al 56% nel latte d'alpeggio proveniente dall'altopiano di Lavarone, al 14% nel latte dalla Val di Sole. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* era presente in quantità pari al 55% della popolazione microbica del latte dalle valli Giudicarie, al 22% in latte da valli di Primiero, al 36% in latte da stalla di Val di Fiemme, al 17% in latte da stalla dall'altopiano di Lavarone e al 6% da latte proveniente da Val di Sole. Si può notare come nei mesi invernali, e quindi nel latte da stalla, prevalesse *Lactococcus cremoris* sub. *cremoris* rispetto al *Lactococcus lactis* sub. *lactis* che invece è stato ritrovato con una maggior frequenza nei campioni di latte prelevati durante i mesi estivi (latte di alpeggio). *Streptococcus thermophilus* è stato ritrovato fra le specie predominanti in 3 campioni su 8: in latte di alpeggio dalle Valli di Primiero (33%) in latte di alpeggio dall'altopiano di Lavarone (56%) e in latte di stalla della Val di Sole (58%).

Di queste tre specie erano sempre presenti biotipi diversi che costituivano la maggior parte della microflora dei latti. Altre specie costituivano una parte minoritaria del quadro microbiologico dei campioni analizzati: *Streptococcus macedonicus* rappresentava il 10% della microflora lattica ritrovata nel campione d'alpeggio delle valli di Primiero, *Enterococcus faecalis* il 19% della comunità microbica del latte di stalla da Val di Fiemme e *Streptococcus suis* il 14% della popolazione del latte d'alpeggio proveniente dalla Val di Fiemme. Accanto a queste hanno fatto da corolla altre specie che sono state ritrovate in percentuali molto inferiori ma che hanno contribuito alla biodiversità dei campioni di latte analizzati.

Conclusioni

Da questo studio è emersa una notevole biodiversità batterica nei campioni di latte analizzati e destinati a differenti tipologie di Nostrano del Trentino. La biodiversità è rappresentata dall'elevato numero di specie identificate tra i 263 isolati, e, soprattutto, dall'elevato numero di ceppi batterici diversi tra loro (116 biotipi). Il dato interessante emerso da questo studio consiste nella non-sovrapposibilità delle comunità microbiche descritte. Ciascun latte analizzato ha presentato infatti una peculiare popolazione batterica, e ceppi presenti in un latte

non sono stati ritrovati in altri provenienti da zone diverse e distanti, né in latte proveniente dalla stessa zona ma raccolto in un diverso periodo dell'anno. Ciò è indice di un forte legame geografico del prodotto al territorio di origine, ma anche di una diversa ricchezza microbica del latte "invernale" rispetto a quello d'alpeggio. Altri studi sull'evoluzione della popolazione microbica durante le fasi di stagionatura dei formaggi consentiranno di descrivere più in dettaglio il ruolo che la microflora indigena del latte svolge in questi prodotti a latte crudo, così fortemente tipici e legati alla zona d'origine.

Bibliografia

- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M., 2001. *Recent advances in cheese microbiology*. Int. dairy J. 11, pp 259-274.
- Cocconcelli P.S., Parisi M.G., Senini L., Bottazzi V., 1997. *Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of Lactobacillus population dynamics in natural whey culture*. Lett. Appl. Microbiol. 25, pp 8-12.
- Ercolini D., Moschetti G., Baiotta G., Coppola S., 2001. *Behaviour of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis*. Curr. Microbiol., Mar 42(3), pp 199-202.
- Heilig H.G., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D., De Vos W.M., 2002. *Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA*. Appl. Environ. Microbiol., Jan 68(1), pp 114-23.
- Poznanski E., Cavazza A., Cappa F., Cocconcelli P.S. in press. *Alpine environment microbiota influences the bacterial development in traditional raw milk cheese*. In corso di stampa su Int. J. Food Microbiol.
- Wouters J.T.M., Ayad E.H., Hugenholtz J., Smit G. 2002. *Microbes from raw milk for fermented dairy products*. Int. dairy J. 12, 91-109.
- Zacchello, P., 1991. *I batteri lattici*. In: *L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari*. A cura di F. Ottavini, Tecniche nuove. 77-110.

Tabella 1 – Primers usati in questo studio

Primer	Sequenza 5'- 3'	Riferimento bibliografico
PC1	AGCAGGGTCG	Poznanski <i>et al.</i> In press
P1	GCGGCGTGCCTAATACATGC	Cocconcelli <i>et al.</i> 1997
P4	CTACGGCTACCTTGTTACGA	Cocconcelli <i>et al.</i> 1997

Tabella 2 – Conte microbiche misurate in ufc/ml sui terreni utilizzati per l'isolamento.

Origine del campione	MRS 45°C	MRS 28°C	MRS 45°C + Vancomicina	MRS 28°C + Vancomicina	M17 45°C	M17 28°C	Agar-latte 45°C	Agar-latte 28°C	KEA	BP ¹ (<i>S. aureus</i>)
<i>Val di Fiemme</i>										
stalla	1,0 × 10 ³	1,0 × 10 ⁵			3,7 × 10 ⁴	3,2 × 10 ⁵	1,0 × 10 ²	1,9 × 10 ⁵	3,5 × 10 ³	-
alpeggio	50	1,0 × 10 ⁴	50	7,7 × 10 ³	3,2 × 10 ³	6,0 × 10 ⁴	50	3,2 × 10 ⁴	2,0 × 10 ⁴	-
<i>Valle di Primiero</i> ²										
alpeggio	6,3 × 10 ³	3,4 × 10 ⁵		9,5 × 10 ³	1,2 × 10 ⁵	4,0 × 10 ⁵	1,4 × 10 ⁶	6,5 × 10 ⁵	2,4 × 10 ⁴	-
<i>Lavarone</i>										
stalla	9,0 × 10 ²	5,1 × 10 ³	50	8,5 × 10 ²	1,3 × 10 ⁴	5,0 × 10 ³	1,0 × 10 ³	9,0 × 10 ³	1,4 × 10 ³	-
alpeggio	1,3 × 10 ⁵	1,6 × 10 ⁶		2,4 × 10 ⁴	1,1 × 10 ⁶	5,8 × 10 ⁶	2,9 × 10 ⁶	4,0 × 10 ⁵	3,6 × 10 ³	-
<i>Val di Sole</i>										
stalla	3,9 × 10 ⁵	4,3 × 10 ⁵	50	1,6 × 10 ⁴	2,6 × 10 ⁶	4,0 × 10 ⁵	1,4 × 10 ⁶	1,2 × 10 ⁵	1,6 × 10 ⁴	-
<i>Valli Giudicarie</i>	5,0 × 10 ²	8,5 × 10 ⁴	5,0 × 10 ²		1,0 × 10 ³	9,6 × 10 ⁴		1,2 × 10 ⁵	6,0 × 10 ³	-

¹ In nessuno dei campioni analizzati è stato ritrovato *Staphylococcus aureus*. Su BP erano cresciute comunque alcune colonie che poi a successiva identificazione si sono rivelate essere appartenenti alla specie *Enterococcus faecalis*.

² Il campione di latte da vacche allevate in stalla proveniente dalle Valli di Primiero non è stato analizzato.

Tabella 3 – Numero totale degli isolati e dei biotipi presenti nei campioni di latte prelevati da caldaia provenienti da zone geografiche e periodi diversi

Zona d'origine del campione	Totale isolati	Biotipi ritrovati
Valli Giudicarie		
stalla	25	9
Valli di Primiero		
alpeggio	38	18
Val di Fiemme		
stalla	29	17
alpeggio	38	15
Altopiano di Lavarone		
stalla	34	15
alpeggio	51	20
Val di Sole		
stalla	48	22
Totale	263	116

Tabella 4 – Specie microbiche e biotipi identificati nei campioni di latte destinati alla produzione di formaggi tipo Nostrano. La percentuale di presenza delle specie identificate è riferita al totale della popolazione batterica presente nei campioni di latte analizzati

Caseificio d'origine e n. biotipi	Specie microbiche ¹ ritrovate e n. biotipi	% sulla popolazione ²
Pinzolo stalla (9 biotipi)	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (2)	55%
	<i>Ignoto</i> ² (1)	15%
	Altro ⁴ (6)	30%
Fiera di Primiero alpeggio (18 biotipi)	<i>S. thermophilus</i> (2)	33%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (2)	22%
	<i>S. macedonicus</i> (1)	10%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (1)	7%
Predazzo stalla (18 biotipi)	Altro (12)	28%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (4)	36%
	<i>Ignoto</i> ⁴ (1)	35%
	<i>S. suis</i> (1)	14%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (1)	3%
	<i>E. faecalis</i> (1)	3%
	<i>Lb. delbrueckii</i> (1)	3%
Predazzo alpeggio (15 biotipi)	Altro (9)	6%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (4)	35%
	<i>E. faecalis</i> (3)	19%
	<i>S. parauberis</i> (1)	5%
	<i>S. suis</i> (2)	5%
	<i>Lb. paracasei</i> (1)	2%
	<i>Ln. lactis</i> (1)	1%
Lavarone stalla (15 biotipi)	Altro (3)	33%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (1)	17%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (2)	8%
	<i>E. faecalis</i> (2)	4%
	<i>Lb. paracasei</i> (3)	1%
Lavarone alpeggio (20 biotipi)	Altro (7)	70%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (6)	56%
	<i>S. thermophilus</i> (2)	17%
	<i>S. macedonicus</i> (2)	2%
	<i>Lb. paracasei</i> (3)	1%
Mezzana stalla (22 biotipi)	Altro (7)	24%
	<i>S. thermophilus</i> (5)	58%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (5)	14%
	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> (2)	6%
	<i>S. parauberis</i> (1)	3%
	<i>E. faecalis</i> (3)	1%
	Altro (6)	17%

¹ Lc. = Lactococcus, Lb.= Lactobacillus, Ln. = Leuconostoc, S. = Streptococcus, E. = Enterococcus. ² La percentuale è riferita sul totale della carica microbica (ufc/ml) rilevata nei diversi campioni analizzati. ³ L'identificazione di alcuni isolati ha dato una sequenza con un'omologia pari al 60% a quella di *Lactococcus lactis*. Affinché un'identificazione sia considerata attendibile l'omologia di sequenza deve essere almeno 95%, perciò questi isolati rimangono da caratterizzare ed identificare. ⁴ Per Altro s'intendono biotipi non identificati o biotipi identificati ma che costituiscono meno dell'1% della popolazione microbica totale.

Figura 1 – Profilo RAPD-PCR con primer PC1. Con **M** è indicato il marker (100 Kb plus ladder, Life Technologies). I restanti 29 pozzetti sono stati caricati con i prodotti d'amplificazione effettuati sui 29 isolati da campione di latte invernale proveniente dal caseificio sociale di Predazzo. A lettera uguale corrisponde profilo di corsa RAPD uguale.

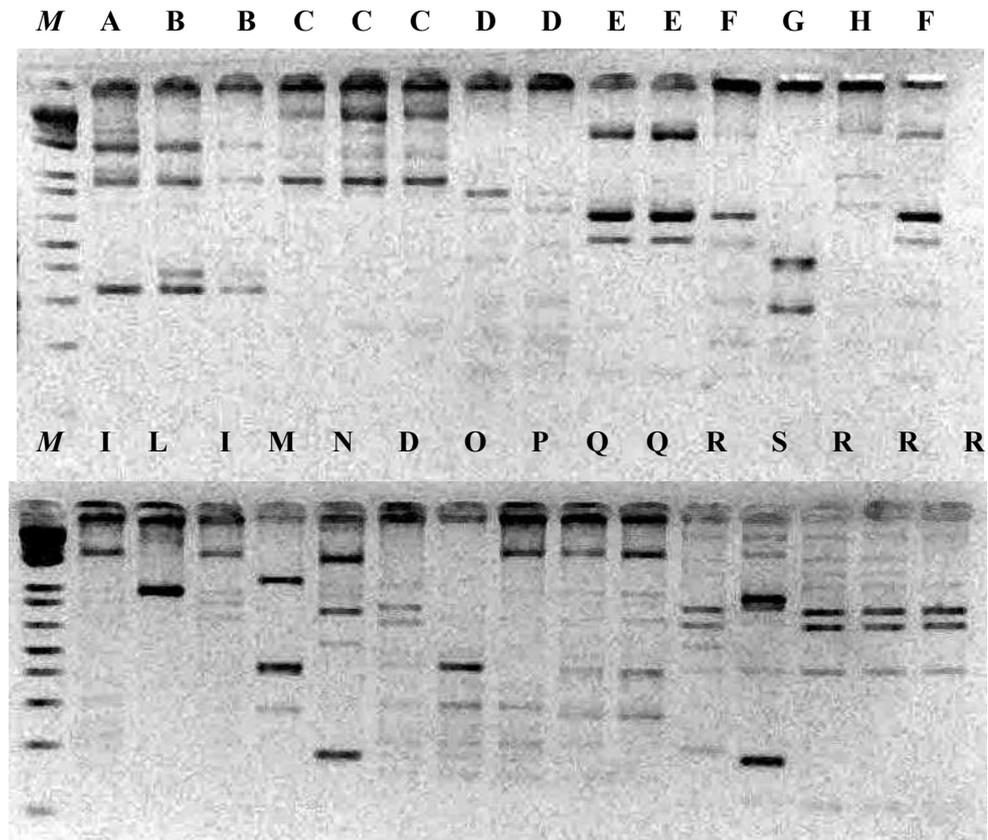


Figura 2 – Profilo RAPD-PCR con primer PC1. Con *M* è indicato il marker (100 Kb plus ladder, Life Technologies). I restanti 25 pozzetti sono stati caricati con i prodotti d'amplificazione effettuati sui 25 isolati da campione di latte proveniente dal caseificio sociale di Pinzolo. A numero uguale corrisponde profilo di corsa RAPD uguale.

