



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE E FORESTALI

Dottorato di Ricerca in Frutticoltura Mediterranea

ANALISI DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RICORRENTI
NEL MIELE

SSD AGR/16 – Microbiologia Agraria

DOTTORANDO
Dott. Milko Sinacori

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof.ssa Maria Antonietta Germanà

TUTOR
Prof. Giancarlo Moschetti

CICLO XXIV- ANNO ACCADEMICO 2013-2014

DOTTORATO



SOMMARIO

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE.....	3
1.1 - IMPORTANZA STORICA ED ECONOMICA DEL MIELE.....	3
1.2 - TIPOLOGIE DI MIELE	9
1.3 - TRASFORMAZIONE DEL NETTARE IN MIELE	11
1.4 - PARAMETRI CHIMICO-FISICI DEL MIELE	12
1.5 - INTERAZIONE DEL MIELE CON I MICRORGANISMI	16
1.6 - METODOLOGIE FENOTIPICHE E GENOTIPICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI.....	20
1.6.1 - Metodologie di prima generazione	22
1.6.2 - Metodologie di seconda generazione.....	22
1.6.3 - Metodologia non colturale: applicazione e vantaggi	25
CAPITOLO 2 - SCOPI DEL LAVORO.....	28
CAPITOLO 3 - ANALISI DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RICORRENTI NEL MIELE MEDIANTE APPROCCIO COLTURALE.....	29
3.1 - MATERIALI E METODI.....	29
3.1.1 - Raccolta dei campioni	29
3.1.2 - Inoculazione	29
3.1.3 - Conte microbiche	33
3.1.4 - Raggruppamento fenotipico degli isolati.....	33
3.1.5 - Caratterizzazione genotipica degli isolati	37
3.1.6 - Calcolo degli indici di biodiversità microbica	43
3.2 - RISULTATI.....	44
3.2.1 - Conte microbiche	44
3.2.2 - Raggruppamento fenotipico ed identificazione molecolare degli isolati ..	46
3.2.3 - Biodiversità microbica dei mieli.....	55
CAPITOLO 4 - ANALISI DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RICORRENTI NEL MIELE MEDIANTE APPROCCIO NON-COLTURALE.....	58
4.1 - MATERIALI E METODI.....	58
4.1.1 - Scelta dei campioni	58
4.1.2 - Estrazione del DNA	58

4.1.3 - Amplificazione PCR-DGGE	59
4.1.4 - Preparazione delle soluzioni necessarie per la corsa elettroforetica.....	61
4.1.5 - Corsa elettroforetica DGGE ed acquisizione dati	62
4.2 - RISULTATI.....	63
CAPITOLO 5 - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	68
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	76
RIFERIMENTI NORMATIVI	87
RINGRAZIAMENTI.....	88

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE

1.1 - IMPORTANZA STORICA ED ECONOMICA DEL MIELE

L'apicoltura è oggi un'attività produttiva diffusa in quasi tutte le aree del mondo, ma antico è il rapporto che lega l'uomo alle api ed alle loro produzioni. I geroglifici egizi (2500 a.C.) testimoniano il passaggio dalla semplice razzia dei favi ai primi tentativi di domesticazione, ma solo con Aristotele si avviarono i primi studi scientifici riguardanti le api e le loro produzioni (Marchenay, 1986). Il miele fu il primo dolcificante utilizzato dall'umanità (Moreschi, 2007) e già Ippocrate ne esaltava il valore nutrizionale e salutistico. Per secoli fu considerato un ingrediente culinario e farmaceutico fondamentale in molte culture e tale rimase sino al XVII sec., quando venne ampiamente rimpiazzato dalla più economica canna da zucchero. L'apicoltura perse allora gran parte della sua importanza commerciale e si trasformò in un'attività marginale senza significativi sviluppi tecnici sino alla metà del XIX secolo. In questi anni, la comparsa delle arnie razionali a telaini mobili (inventate da Lorenzo Langstroth nel 1851) ed il proliferare della carta stampata, consentirono la diffusione della conoscenza di aspetti operativi, scientifici e produttivi, segnando la nascita della cosiddetta apicoltura moderna.

In Europa l'apicoltura è oggi una realtà economica consolidata, gestita da operatori specializzati, con una densità media di 2,8 alveari/km² (Naldi *et al.*, 2009). Il miele è ovviamente la produzione principale ma sempre maggiore è l'interesse sia verso gli altri prodotti dell'alveare (propoli, pappa reale, veleno, cera), che verso le api quali

pronubi ed ottimi bioindicatori. La Legge 313/2004, infatti, “riconosce l’apicoltura come attività d’interesse nazionale, utile per la conservazione dell’ambiente naturale, dell’ecosistema e dell’agricoltura in generale, in quanto finalizzata a garantire l’impollinazione naturale e la biodiversità di specie apistiche, con particolare riferimento alla salvaguardia della razza di ape italiana (*Apis mellifera ligustica*) e delle popolazioni di api autoctone tipiche”. Tra queste ricordiamo l’*Apis mellifera sicula* (M.): razza autoctona siciliana, nota per la sua rusticità e la maggiore resistenza alle patologie. Per quel che riguarda l’Italia, i dati sulla popolazione apistica rimangono ancora piuttosto approssimativi, nonostante l’istituzione di un’anagrafe apistica nazionale sancita dal Decreto Ministeriale del 4 dicembre 2009. Dopo le pesanti morie di inizio millennio, che hanno registrato il loro picco nel 2008, si è assistito negli ultimi anni ad un timido incremento. Secondo gli ultimi dati dell’Osservatorio Nazionale Miele (www.informamiele.it), risalenti al 2010, si stima che la presenza sul territorio nazionale sia di circa 1.100.000 alveari con una produzione totale di poco superiore alle 23.000 tonnellate (Tab. 1).

Il mercato interno è dominato dal miele fresco (circa il 60% del totale), mentre la parte restante è rappresentata quello da industria (Fanelli e Tamburri, 2004). Il primo è utilizzato prevalentemente come dolcificante per il consumo domestico, il secondo trova impiego nell’industria dolciaria, cosmetica e farmaceutica.

Tab. 1. Produzione di miele stimata nell'anno 2010.

REGIONE	Alveari	Produzione miele (tonnellate)
ABRUZZO	42.651	963
BASILICATA	44.734	986
CALABRIA	57.449	1.093
CAMPANIA	48.208	910
EMILIA ROMAGNA	104.556	2.814
FRIULI VENEZIA GIULIA	27.609	502
LAZIO	95.636	1.822
LIGURIA	26.320	504
LOMBARDIA	136.799	2.198
MARCHE	37.629	842
MOLISE	8.500	103
PIEMONTE	113.325	2.832
PUGLIA	14.200	429
SARDEGNA	45.714	692
SICILIA	103.172	1.878
TOSCANA	87.449	1.690
TRENTINO	61.973	1.082
UMBRIA	33.097	488
VALLE D'AOSTA	7.477	153
VENETO	60.698	1.067
ITALIA TOTALE	1.157.196	23.048

Fonte: Osservatorio Nazionale Miele.

Il documento “Prime valutazioni sull’andamento produttivo e di mercato per la stagione 2013”, redatto dall’Osservatorio Nazionale Miele, mostra come la produzione globale si sia incrementata del 10% dal 2006 al 2010 con una produzione totale di circa 1,5 milioni di tonnellate ed una crescente importanza del prodotto asiatico (Fig. 1). Infatti, in seguito all’impegno assunto dal Governo cinese per la riduzione nell’uso di antibiotici nel 2004 e la conseguente revoca del divieto d’importazione da parte della Comunità Europea, le importazioni provenienti da

questa area si sono notevolmente incrementate ed oggi la Cina gestisce da sola circa il 39% delle esportazioni, in buona parte destinate al mercato europeo.

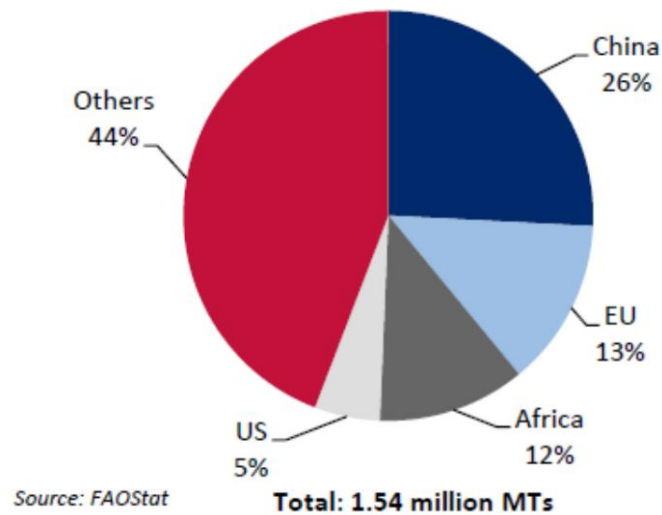


Fig. 1. Produzione mondiale di miele.

L'Unione Europea, di contro, ha il più alto consumo pro-capite di miele, ma la produzione interna copre solo il 60% della richiesta e subisce quindi la crescente pressione dei mercati internazionali. I prodotti esteri, provenienti anche da Argentina, Messico, Cile, ecc., sono spesso più economici del prodotto locale (Tab. 2), ma offrono minori garanzie igienico-sanitarie per il consumatore finale (Seijo *et al.*, 2011). Normalmente questi prodotti soddisfano una fascia di mercato non particolarmente attenta alla qualità, ma la loro presenza nella grande distribuzione, anche sotto forma di miscele di diversa origine, riduce comunque i margini di commercializzazione del prodotto interno.

Tab. 2. Prezzi d'importazione dei mieli in Europa.

Origine	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Cina	1,30	0,86	0,93	1,00	1,12	1,24	1,26
Argentina	1,81	1,09	1,20	1,26	1,69	2,00	2,24
Messico	2,17	1,57	1,51	1,38	1,67	2,14	2,35
Cile	2,29	1,54	1,29	1,36	1,77	2,19	2,57
Brasile	1,84	1,23	1,31	1,37	1,91	2,02	2,21
Uruguay	1,94	1,28	1,20	1,22	1,73	1,97	2,15
Cuba	1,96	1,40	1,22	1,22	1,30	1,92	2,08
India	1,56	1,16	1,18	1,29	1,66	1,77	2,01
Nuova Zelanda	4,68	5,08	4,39	5,06	5,13	4,50	6,77
Ucraina	1,21	1,08	1,00	1,11	1,87	1,70	2,02
Guatemala	2,35	1,34	1,36	1,53	1,85	2,06	2,54
El Salvador	1,54	1,17	1,48	1,37	1,91	2,27	2,55
Australia	3,24	2,16	2,08	2,28	2,05	2,42	2,85
Turchia	2,70	2,62	2,46	4,24	5,53	3,85	2,79

Fonte: Eurostat Comext. Valori espressi in euro.

In questo mercato globale è ovvio che la concorrenza del prodotto interno debba fondarsi principalmente sui maggiori standard qualitativi, in gran parte determinati dai fattori climatici, dalla professionalità degli operatori e dall'industriosità delle nostre api (Butta *et al.*, 1983). Per quel che riguarda l'Italia, inoltre, è possibile puntare anche sulla varietà floristico-vegetazionale e sulla diffusione delle tecniche di nomadismo, che consentono al nostro Paese di detenere il primato per il numero di mieli uniflorali (Arculeo e Sabatini, 2007), da sempre considerati di maggior pregio rispetto al più comune millefiori.

Si sente comunque la mancanza di regole chiare e precise, poiché queste lacune legislative e gli scarsi controlli effettuati sui prodotti d'importazione aprono la strada a possibili tentativi di frode. I prezzi sensibilmente più bassi dei prodotti esteri lasciano più di qualche perplessità sulla qualità del prodotto importato: frequenti sono le miscele di miele di dubbia origine, l'uso indiscriminato di antibiotici vietati

dal Decreto Legislativo n. 193/2006 (come cloramfenicolo, tetraciclina, streptomina e sulfamidici) ed i ripetuti trattamenti termici, attuati per aumentare la shelf-life e ridurre i fenomeni fermentativi (Bogdanov *et al.*, 2003). Ciò ovviamente modifica le caratteristiche del prodotto, alterandone il quadro vitaminico, amminoacidico ed anche lo spettro microbico (Butta *et al.*, 1983). Nonostante questo, il miele viene sempre più apprezzato non solo per il suo valore nutrizionale e come fonte energetica a rapido assorbimento di carboidrati, ma anche per le sue caratteristiche salutistiche (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Le sue proprietà antiossidanti, infatti, sono in grado di inibire o ritardare il danneggiamento cellulare dovuto ai radicali liberi (Beretta *et al.*, 2007) e favorire la crescita di nuovi tessuti, mentre la naturale igroscopicità lo rende un ingrediente ideale nella produzione di cosmetici. Studi recenti ne propongono l'utilizzo anche come prodotto omeopatico alternativo, per la cura dell'igiene orale, delle ferite, delle ustioni e perfino come potenziale ausilio in campo oncologico (Lay-Flurrie, 2008; Molan, 2001a, 2001b; Bardy *et al.*, 2008; Estevinho *et al.*, 2008). Molto interessanti sono inoltre le proprietà antisettiche dovute ad acidità, scarsa disponibilità di acqua libera, elevata viscosità, scarso contenuto proteico, presenza di glucosio-ossidasi (Bogdanov *et al.*, 2008) ed altri composti quali flavonoidi, derivati fenolici (Ceașu *et al.*, 2009) e PLA (acido 2-idrossi-3-fenilpropanoico). Nonostante questo, diverse specie di microrganismi riescono comunque a sopravvivere nel miele, almeno in forma latente. Alcuni risultano patogeni per l'uomo o per l'apiario, mentre altri sono responsabili di fenomeni fermentativi che alterano le caratteristiche chimiche ed organolettiche. Il consumo di prodotto fresco viene comunque considerato sufficientemente sicuro, ma

il miele è anche un ingrediente e come tale può contaminare altri alimenti, nei quali la flora microbica originale potrebbe trovare migliori condizioni di proliferazione. Tutto ciò dimostra come la qualità del miele dipenda, non solo dalle sue proprietà fisico-chimiche, ben definite dalla Direttiva Europea 2001/110, ma anche da aspetti microbiologici ancora poco conosciuti e largamente ignorati dalla legislazione comunitaria. Appare chiaro quindi come una più approfondita indagine in tal senso possa essere considerata un valido strumento per la valorizzazione e l'attestazione igienico-sanitaria del prodotto ed anche per la ricerca di ceppi potenzialmente utili in campo apistico, alimentare e farmaceutico.

1.2 - TIPOLOGIE DI MIELE

Il Decreto Legislativo n. 179 del 21 maggio 2004, la Direttiva 2001/110/CE ed il Codex Alimentarius (CODEX STAN 2001) definiscono il miele come “la sostanza naturale che le api (*A. mellifera*) producono dal nettare di piante o dalle secrezioni provenienti da parti vive di piante o dalle sostanze secrete da insetti succhiatori che si trovano su parti vive di piante che esse bottinano, trasformano, combinandole con sostanze specifiche proprie, depositano, disidratano, immagazzinano e lasciano maturare nei favi dell'alveare”. In base alla matrice zuccherina originaria possiamo distinguere tra mieli di nettare e di melata. I primi sono ottenuti partendo dal nettare prodotto dalle piante, mentre i secondi si originano da una soluzione zuccherina escreta da insetti (quali afidi e cocciniglie) che, nutrendosi della linfa vegetale, assorbono le sostanze azotate ed espellono gli zuccheri in eccesso sotto forma di melata. Questa differisce dal nettare per la presenza di enzimi prodotti dal sistema

digerente dell'insetto fitofago e per una maggior concentrazione di oligosaccaridi. Entrambi i prodotti comunque vengono sottoposti ad una complessa alterazione fisico-chimica, ad opera degli enzimi prodotti dalle api, che si concluderà con la trasformazione del prodotto iniziale in miele. Tra i mieli di nettare possiamo ulteriormente distinguere i multiflora dai monoflora. I primi non manifestano le caratteristiche predominanti di una specifica fioritura, mentre i secondi presentano caratteristiche fisico-chimiche peculiari, correlate all'essenza prevalentemente bottinata. Il nettare, infatti, è una soluzione zuccherina con una composizione chimica relativamente costante, ma l'essenza d'origine influisce sulla composizione pollinica, sul rapporto reciproco degli zuccheri principali (glucosio e fruttosio), sulla presenza di composti secondari quali: sali minerali, composti aromatici, enzimi ed acidi organici. Colore, aroma e sapore sono quindi fortemente legati alle diverse specie botaniche presenti nell'area di raccolta, a loro volta espressione delle caratteristiche climatiche, pedologiche e di uso del territorio. Questo forte legame prodotto-territorio, che influenza la scelta del consumatore ed il valore economico del prodotto è riconosciuto anche dalla normativa vigente. La Direttiva Comunitaria 2001/110/CE e il Decreto Legislativo 179/2004 prevedono, infatti, due livelli di denominazione geografica, una obbligatoria ed una volontaria. La prima impone al produttore di riportare in etichetta il paese d'origine, mentre la seconda consente un'indicazione geografica più precisa, quale il nome di una regione o di una specifica area territoriale. Resta ambigua, invece, la normativa riguardante l'origine botanica e soprattutto appare problematica la verifica dei dati riportati in etichetta. Diversi studi sono stati compiuti negli ultimi anni per rispondere a questa esigenza (Anklam,

1998) ed alcuni autori hanno anche proposto metodi alternativi quali l'uso di radio isotopi diversi dal carbonio (White, 2000) o il ricorso alla lingua ed al naso elettronici (Dias *et al.*, 2008; Ghidini *et al.*, 2008). Il principale metodo per verificare l'origine del prodotto rimane comunque la melissopalinologia. Questa permette, attraverso l'analisi microscopica dei granuli pollinici, di risalire all'origine geografica e botanica, ma la tecnica presenta comunque dei limiti oggettivi. Il metodo si basa, infatti, sull'esperienza del singolo operatore nell'individuare la corrispondenza tra i dati riportati in etichetta e le composizioni polliniche più o meno complesse presenti nel campione. Quest'esperienza difficilmente trasmissibile ed estremamente soggettiva determina quindi una scarsa riproducibilità delle analisi effettuate (Oddo *et al.*, 2007). Si consideri inoltre come in alcuni mieli uniflorali (ad esempio quello di agrumi) i granuli pollinici specifici siano ipo-rappresentati (ossia meno del 10% circa del totale dei pollini presenti nel campione) e come i pollini riscontrati nel miele derivino non solo dalla raccolta diretta da parte delle api operaie (arricchimento primario), ma anche da varie fonti di inquinamento esterne quali: il vento, l'uso di favi che in passato hanno contenuto polline, le operazioni di smielatura, ecc. (arricchimento secondario). Tutto ciò ovviamente disturba l'analisi e rende più incerto il risultato.

1.3 - TRASFORMAZIONE DEL NETTARE IN MIELE

La bottinatura segna l'inizio di quel complesso processo che trasformerà il nettare o la melata in miele. Le sostanze zuccherine immagazzinate dall'ape nella borsa

melaria, vengono trasportate nell'alveare, rigurgitate e passate diverse volte di ape in ape (trofallassi) prima di essere deposte in una celletta per la maturazione finale. Il microclima all'interno dell'alveare, favorirà il completamento di questa progressiva evaporazione, portando il contenuto in acqua dall'80% iniziale sino a valori inferiori al 18%. Solo allora la celletta sarà sigillata con un tappo in cera (opercolatura) ed il prodotto potrà finalmente considerarsi idoneo per il consumo umano. La formazione del miele non si limita però ad una mera riduzione del contenuto in acqua. Durante la trofallassi, infatti, le secrezioni salivari delle api arricchiscono la soluzione zuccherina d'origine con diversi enzimi causando varie trasformazioni chimiche principalmente a carico degli zuccheri (Oddo *et al.*, 1997).

1.4 - PARAMETRI CHIMICO-FISICI DEL MIELE

Il miele dal punto di vista chimico (Codex Alimentarius, 2001) è una soluzione satura di zuccheri, ma contiene anche una complessa miscela di aminoacidi, minerali, sostanze aromatiche, enzimi, vitamine, pigmenti, cera e polline (Bogdanov *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1999). Di seguito sono riportati i principali parametri chimico-fisici del miele, mentre la tabella 3 riassume i valori medi di composizione. Questi fattori non sono stabili e possono variare da campione a campione e soprattutto in base all'origine botanica.

Acqua. La quantità di acqua presente nel miele dipende da molti fattori quali: le condizioni ambientali, la scelta del periodo di raccolta, la lavorazione e lo stoccaggio in locali più o meno adeguati (Molan, 2002). Il contenuto in acqua influenza la shelf-life del prodotto. Valori normali oscillano tra il 14 ed il 21%, con un optimum

prossimo al 17%. Nei mieli non pastorizzati, un'elevata presenza di acqua libera può determinare cristallizzazione anomala ed insorgenza di fenomeni fermentativi ad opera dei lieviti presenti.

Zuccheri. Gli zuccheri nel miele rappresentano il 95-97% della sostanza secca (Alvarez-Saurez *et al.*, 2010). Di questi fruttosio e glucosio costituiscono circa il 40% ed il 30% degli zuccheri totali, con quest'ultimo che influenza direttamente la tendenza del prodotto a cristallizzarsi. Altri zuccheri meno rappresentati sono il maltosio (7%), il saccarosio (1,5%) ed altri monosaccaridi (4%). Questi zuccheri derivano in parte dal nettare, mentre altri si originano in seguito a trasformazioni durante la maturazione del prodotto.

Sali minerali. Il loro contenuto è compreso tra lo 0,02% e l'1%. Il potassio è quello maggiormente rappresentato, mentre altri elementi (Cl, S, Ca, Na, P, Mg, Si, Fe, Mn e Cu) sono presenti solo in tracce.

Sostanze azotate. Le sostanze azotate nel miele sono alquanto ridotte, si attestano tra lo 0,2 ed il 3% ed includono proteine, enzimi e aminoacidi liberi. Proteine e aminoacidi provengono essenzialmente dai granuli pollinici trasportati dalle api durante la bottinatura e la loro proporzione relativa è legata all'origine botanica (Christy *et al.*, 2010). Una particolare classe di sostanze proteiche è rappresentata dagli enzimi, tra i quali ricordiamo la glucosio-ossidasi, l'invertasi e l'amilasi (Bansal *et al.*, 2005).

Composti secondari. Il miele presenta solo piccole quantità di vitamine (principalmente B e C) prevalentemente di origine pollinica. Nel prodotto troviamo anche composti volatili come: alcool, chetoni, aldeidi, esteri e terpeni (Zhou *et al.*,

2002). Ricordiamo inoltre la presenza di pigmenti (xantofille, flavonoidi, carotenoidi ed antociani) e dell'idrossimetilfurfurale (HMF). Questo composto, assente nel miele appena estratto, si forma successivamente per degradazione del fruttosio in ambiente acido. Un elevato contenuto in HMF è quindi indice di un miele vecchio o trattato termicamente.

pH. Il pH medio del miele è compreso tra 3,2 e 4,5 con i picchi più alti riscontrabili nei mieli di melata. Valori così bassi contribuiscono ad inibire lo sviluppo della fauna microbica e sono dovuti alla presenza di vari acidi organici, tra i quali ricordiamo l'acido gluconico, prodotto dalle reazioni catalizzate dalla glucosio-ossidasi.

Viscosità. Il miele presenta una notevole viscosità, causata dall'elevata presenza di zuccheri. Essa diminuisce rapidamente fino ai 35-40 °C, rimanendo poi pressoché costante a temperature più alte. Ciò rende difficoltosi gli scambi gassosi, limitando lo sviluppo di molti microrganismi aerobi.

Igroscopicità. L'elevata concentrazione di zuccheri tende a favorire l'assorbimento d'acqua dall'ambiente circostante. Eccessiva umidità durante la raccolta e lo stoccaggio del prodotto possono aumentare la quantità di acqua libera, facilitando l'avvio dei fenomeni fermentativi.

Tab. 3. Composizione chimica media del miele.

Carboidrati (75-80%)	Acidi (0,1-1,5%)	Minerali (0,1-1,5%)	Amminoacidi	Enzimi	Vitamine	Alcoli	Aldeidi e chetoni	Esteri	Costituenti minori
Monosaccaridi: (70-75%) Fruttosio Glucosio	Ac. gluconico Ac. acetico Ac. Butirrico Ac. α-chetoglutarico Ac. citrico	K Cl S Na Ca	Prolina Fenilalanina Ac. aspartico Ac. glutammico Leucina	Amilasi Saccarasi Glucosio-ossidasi Catalasi Fosfatasi	Ac. ascorbico Riboflavina Ac. pantotenico Niacina Tiamina Piridossina Biotina Ac. Folico	Metanolo Etanolo 1-propanolo 2-propanolo 1-butanolo 2-butanolo 2-metil-1-propanolo 2-metil-1-butanolo 3-metil-1-butanolo 3-metil-2-butanolo 1-pentanololo 2-pentanololo Alcool benzilico 2-fenil-etanolo 3-fenil-1-propanolo 4-fenil-1butanolo Alcool furfurilico	Formaldeide Acetaldeide Propionaldeide Dimetilchetone Ald. butirrica Ald. isobutirrica Ald. valerianica Ald. isovalerianica Ald. caprinica Metacroleina Diacetile Benzaldeide Furfurale HMF 3-idrossi-2-butanone	Formiato di metile Formiato di etile Acetato di metile Acetato di etile Acetato di propile Acetato di isopropile Propionato di metile Butirrato di etile Butirrato di etile Butirrato di isoamile Valerianato di metile Valerianato di etile Isovalerianato di metile Piruvato di metile Benzoato di metile Benzoato di etile Fenilacetato di metile Fenilacetato di etile Metilantranilato	Lipidi: Gliceridi Steroli Fosfolipidi Ac. palmitico Ac. oleico Ac. laurico Ac. stearico Ac. linoleico Ac. miristico Tracce di cera Polifenoli Flavonoidi Colina Acetilcolina Elementi corporeali: Polline Spore fungine Alghe Lieviti
Disaccaridi: Gentibiosio Kojibiosio Isomaltosio Laminaribiosio Maltosio Maltulosio Nigeriosio Saccarosio Trealosio Turanosio	Ac. formico Ac. fumarico Ac. lattico Ac. maleico Ac. malico Ac. Ossalico Ac. piroglutammico Ac. succinico Ac. tartarico	P Mg Si Fe Mn Cu Al Sb Ag B Ba Be Bi Cr I Li Mo Au Pb Sn Ti V Zn Zr	Valina Isoleucina Alanina Arginina Cistina Glicina Istidina Lisina Metionina Serina Tiroxina Treonina Triptofano						
Trisaccaridi e zuccheri superiori: Centosio 1-chestosio Erlosio Isomaltotriosio Isopanosio Maltotriosio Melezitosio Panosio Raffinosio Isomaltotetraiosio Isomaltopentaosio									

Fonte: "Conoscere il miele" (Persano Oddo *et al.*, 1997).

Abbreviazioni: ac, acido; ald, aldeide.

Cristallizzazione. Tale fenomeno è naturalmente riscontrabile in quei mieli nei quali si registri un rapporto fruttosio/glucosio minore di 1,3. In una soluzione ipersatura (concentrazione degli zuccheri superiore al 70%), infatti, il glucosio precipita spontaneamente. Ciò aumenta la disponibilità di acqua in alcune aree del contenitore, dove potranno avere origine i fenomeni fermentativi. Temperature alte evitano la cristallizzazione ma danneggiano il prodotto; mentre una conservazione a valori inferiori a 10 °C consente di rallentare notevolmente il processo.

1.5 - INTERAZIONE DEL MIELE CON I MICRORGANISMI

Il miele è una soluzione satura ottenuta attraverso un processo di maturazione del nettare, nel quale il prodotto subisce una spinta evaporazione fino al raggiungimento di un contenuto medio in acqua compreso tra il 15% ed il 18%. L'elevata concentrazione di zuccheri limita la quantità di acqua libera disponibile per i microrganismi, inibendone lo sviluppo ed aumentandone la mortalità (Malika *et al.*, 2004). Di conseguenza la popolazione microbica, presente nelle prime fasi di maturazione, decresce man mano che le condizioni del mezzo divengono meno favorevoli (Ruiz-Argueso *et al.*, 1975). Altri fattori di inibizione sono: l'elevato contenuto in zuccheri, l'elevata acidità ($\text{pH} \leq 4,5$), lo scarso contenuto proteico, l'alta viscosità e la presenza di sostanze inibenti. Tra le sostanze inibenti, il principale responsabile della stabilità microbica del miele resta comunque l'enzima glucosio-ossidasi, secreto dalle ghiandole ipofaringee delle api. Questo enzima agisce in un range di pH compreso tra 5,5 e 8,0 e risulta attivo solo quando il miele viene diluito (White *et al.*, 1963). Così, in presenza di acqua ed ossigeno, l'enzima ossida il D-

glucosio con la formazione di perossido di idrogeno (H_2O_2) e di gluconolattone, che viene idrolizzato ad acido gluconico (Fig. 2) (Bogdanov *et al.*, 2008).

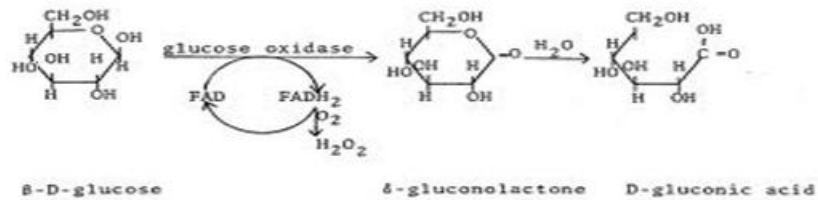


Fig. 2. Formazione del perossido di idrogeno per azione della glucosio-ossidasi.

Il perossido svolge efficacemente la sua azione antimicrobica, ma è facilmente distrutto dal calore o dalla catalasi, che lo scompone nuovamente in acqua ed ossigeno (Weston, 2000). Alcuni mieli comunque, anche in presenza di catalasi, manifestano un'attività antisettica evidente e probabilmente legata ad altri fattori (Snow e Harris, 2004). In Nuova Zelanda il miele di manuka (*Leptospermum scoparium*), ad esempio, viene comunemente considerato un prodotto medicinale (Allen *et al.*, 1991) con proprietà antimicrobiche contro patogeni quali *Staphylococcus aureus* ed *Helicobacter pylori* (Somal *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 2002). Diversi autori (Ceașu *et al.*, 2009; Molan, 1992) affermano che i flavonoidi e i derivati fenolici dell'acido benzoico e cinnamico possono contribuire (anche se in modo meno decisivo rispetto al perossido di idrogeno) a limitare lo sviluppo di batteri Gram positivi e Gram negativi; mentre Weston (2000) ha dimostrato che la reazione tra il perossido e questi acidi determina la formazione di composti stabili anche in presenza della catalasi.

Altra sostanza con azione antimicrobica riscontrata nel miele è il PLA (Mu *et al.*, 2012). Quest'acido organico risulta attivo contro batteri Gram positivi come: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus cereus*; Gram negativi come: *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* (Dieuleveux *et al.*, 1998a, 1998b; Ohhira *et al.*, 2004); lieviti quali *Candida pulcherrima* (Schwenninger *et al.*, 2008) e diversi funghi filamentosi, alcuni anche micotossinogeni, come *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium citrinu*. (Lavermicocca *et al.*, 2003).

Alcuni microrganismi riescono comunque a sopravvivere in questa complessa matrice e la loro presenza deriva da contaminazioni che possiamo distinguere in primarie e secondarie. Le primarie, di difficile controllo, si originano dall'ambiente circostante e dall'involontario trasporto dei microrganismi da parte delle api. Le secondarie, invece, dipendono dalla manipolazione da parte dell'uomo, dalle attrezzature utilizzate, dalle contaminazioni incrociate e possono essere ridotte, ma non completamente eliminate, mediante il ricorso alle corrette pratiche apistiche.

Gli studi effettuati in precedenza mostrano che la concentrazione delle diverse specie di microrganismi nel miele può essere compresa tra zero e diverse migliaia di UFC (Unità Formanti Colonia) per grammo. Questa variabilità dipende da diversi fattori, come: l'origine botanica e geografica (Al-Mamary *et al.*, 2002), la freschezza, il periodo di raccolta e le tecniche analitiche utilizzate (Snowdon e Cliver, 1996). Studi su mieli francesi (Tysset e Rousseau, 1981) ed argentini (Iurlina e Fritz, 2005) riportano un numero di batteri di circa 200-250 UFC/g e di circa 100-150 UFC/g per

lieviti e funghi filamentosi; mentre nei mieli italiani (Piana *et al.*, 1991) e giapponesi (Nakano e Sakaguchi, 1991) sono stati riscontrati valori più bassi.

Diverse sono le specie batteriche riscontrabili nel miele. Alcune, come *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*, possono essere patogeni umani (Snowdon e Cliver, 1996) altre causano gravi patologie nell'apiario (Nakano e Sakaguchi, 1991; Alippi *et al.*, 2002; Lauro *et al.*, 2003). Tra queste ad esempio il *Paenibacillus alvei* ed il *Paenibacillus larvae*, agenti eziologici della peste europea ed americana. Riguardo ai patogeni umani gli studi si focalizzano principalmente sulla presenza di *C. botulinum* (Saraiva *et al.*, 2012). Infatti, anche se la contaminazione è in genere molto limitata, bastano pochi propaguli nell'intestino dei lattanti per avere delle conseguenze talvolta funeste. Ciò non avviene invece in individui adulti, dove le spore del patogeno non trovano condizioni favorevoli al loro sviluppo. Il consumo del prodotto fresco tal quale è comunque ritenuto sufficientemente sicuro, ma il suo carico biotico può essere trasmesso a matrici complesse nei casi in cui il miele viene utilizzato come ingrediente senza l'applicazione di idonei protocolli di produzione (Snowdon e Cliver, 1996).

I lieviti sono microrganismi comunemente presenti nel miele. Diversi autori (Iurlina e Fritz 2005; Piana *et al.*, 1991) hanno riscontrato un'incidenza compresa tra il 50-60% dei campioni analizzati. Tra quelli più comunemente rilevati, ricordiamo: *Zigosaccharomyces rouxii*, *Zigosaccharomyces mellis*, *Saccharomyces cerevisiae* (Carvalho *et al.*, 2006), *Saccharomyces rosei* (Popa *et al.*, 2009). Questi microrganismi provenienti dal nettare sono normalmente innocui per l'uomo, ma in condizioni sfavorevoli (umidità maggiore del 21%) proliferano molto rapidamente

riducendo la shelf-life e la qualità del prodotto. Essi, infatti, danno luogo a fermentazioni che riducono la concentrazione degli zuccheri ed alterano il rapporto saccarosio, glucosio e fruttosio rendendo il prodotto inadatto al consumo fresco. In uno studio compiuto in Spagna su un totale di 176 campioni di mieli (Seijo *et al.*, 2011) è riportata la presenza di numerosi funghi filamentosi, quali *Cladosporium* spp. (63% dei campioni), *Myxomycetes* spp. (32%), *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. (26%). Altri patogeni vegetali come *Alternaria* spp. e *Botrytis* spp. sono più rari e presenti in una percentuale inferiore dei campioni. Dimou *et al.* (2006), confrontando mieli di melata di abete ed pino hanno verificato che le spore del genere *Coleosporium* sono riscontrabili solo in quest'ultimo, dimostrando una certa correlazione tra l'origine del miele e le specie fungine rinvenute.

1.6 - METODOLOGIE FENOTIPICHE E GENOTIPICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI

L'analisi microbica delle matrici alimentari è di fondamentale importanza non solo a scopo conoscitivo, ma anche per l'attestazione igienico-sanitaria, poiché i prodotti oggetto di studio sono per loro natura destinati al consumo umano. Prima della diffusione delle analisi genetiche, l'identificazione delle diverse specie microbiche presenti poteva avvenire solo mediante le tradizionali tecniche fenotipiche, ma benché queste siano ancora considerate fondamentali, oggi risultano da sole poco attendibili (Settanni *et al.*, 2005). Il metodo richiede tempi lunghi e talvolta i risultati sono di difficile interpretazione, poiché le caratteristiche che contraddistinguono un

organismo non sono sempre così nette. I microrganismi appartenenti al genere *Bacillus* ad esempio sono notoriamente Gram positivi, ma possono reagire alla colorazione in modo variabile o addirittura negativo soprattutto se in fase di crescita. Non tutte le caratteristiche rilevabili, inoltre, sono necessarie per lo studio di un particolare gruppo microbico e quindi il ricercatore deve di volta in volta scegliere la giusta combinazione di saggi per una corretta identificazione del microrganismo oggetto di studio.

Fortunatamente il ricorso ad analisi genetiche consente oggi di bypassare questi limiti, riducendo notevolmente i tempi di analisi e la soggettività d'interpretazione dei dati morfologici e biologici. L'approccio genetico si basa, infatti, sull'analisi del DNA genomico, una molecola stabile che rimane praticamente inalterata a meno che gli organismi non siano sottoposti a stress ambientali intensi e ripetuti nel medio-lungo periodo (Settanni e Corsetti, 2007). Ovviamente i risultati ottenuti devono mostrare una certa coerenza con quelli rilevati mediante l'analisi tradizionale affinché quest'approccio polifasico possa fornire un'identificazione completa ed affidabile.

Le metodologie genotipiche possono essere ulteriormente suddivise in tecniche di prima e seconda generazione (Rosselló-Mora ed Amann, 2001). Nelle prime il DNA viene analizzato mediante analisi di restrizione, mentre nelle seconde si fa ricorso alla PCR (Polimerase Chain Reaction).

1.6.1 - Metodologie di prima generazione

Tra le tecniche molecolari di prima generazione l'RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) è una di quelle più utilizzate. Essa si basa sull'ottenimento di frammenti di DNA per azione di enzimi di restrizione (endonucleasi), che eseguono il taglio dell'acido nucleico solo in presenza di sequenze nucleotidiche complementari. E' sufficiente però la variazione anche di una sola base in corrispondenza della sequenza di riconoscimento, affinché l'enzima non sia più in grado di legarsi al sito complementare per il taglio. In conseguenza di questi polimorfismi si otterranno quindi dei profili di restrizione con bande che possono essere ritenute tipiche di una determinata specie. In considerazione di ciò, questa tecnica è stata utilizzata in passato per l'identificazione dei microrganismi. Si riteneva sufficiente, infatti, la comparazione tra i ceppi oggetto di studio ed i ceppi tipo precedentemente identificati. Oggi si preferisce ricorrere ad approcci polifasici, che prevedono l'utilizzo coordinato di diverse tecniche molecolari.

1.6.2 - Metodologie di seconda generazione

Come accennato in precedenza, le metodologie di seconda generazione si basano sull'uso della PCR. Dopo la sua introduzione, ad opera di Mullis nel 1983, questa tecnica è divenuta in breve tempo uno strumento indispensabile per coloro che si occupano di biologia molecolare. Il metodo consente di ottenere in modo rapido ed economico una grande quantità di molecole repliche di un qualunque tratto di DNA oggetto di studio, a condizione di conoscere le sequenze a monte ed a valle del segmento target. Ciò, infatti, è necessario per la scelta dei primer di innesco, a partire

dai quali la polimerasi inizierà a sintetizzare la nuova elica, sulla base dello stampo fornito dalla vecchia molecola di DNA (Scialpi e Mengoni, 2008). Negli ultimi anni, studi compiuti sugli operoni codificanti per l'rRNA ribosomiale (Jensen *et al.*, 2002), ne hanno evidenziato l'efficacia nella verifica dell'eterogeneità inter ed intra-specifica (Moschetti *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2001). Le aree più interessanti in tal senso sono quelle che codificano per le regioni ribosomiali 5S, 16S e 23S. Il gene 16S rRNA, ad esempio è quello maggiormente utilizzato per l'identificazione molecolare dei batteri. Queste regioni contengono, infatti, sequenze altamente conservate a causa degli obblighi strutturali e funzionali dei ribosomi, ma le mutazioni in alcuni geni sono tollerate poiché ancora compatibili con la sopravvivenza del microrganismo. Ad esempio, un ceppo batterico che a causa di una mutazione non presenta il gene per l'utilizzo del lattosio, potrebbe utilizzare altri zuccheri come fonte alternativa di carboidrati. Tali molecole possono quindi essere considerate dei veri e propri cronometri molecolari (Weisburg *et al.*, 1991), estremamente utili in una valutazione accurata della similarità e delle relazioni evolutive tra i vari gruppi di microrganismi. Le regioni molto conservate, infatti, consentono l'individuazione del genere, quelle ipervariabili della specie, mentre quelle random danno indicazioni sui ceppi.

La RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) è una delle varianti della PCR classica. La tecnica consente di processare lunghi tratti di DNA genomico dell'organismo target mediante l'utilizzo di un singolo primer con una lunghezza generalmente compresa tra 8 e 12 basi. La PCR viene realizzata in condizioni di bassa stringenza (basse temperature di annealing) rendendo stabili gli appaiamenti tra

primer e DNA, anche in presenza di sequenze non perfettamente appaiate. Se le diverse sequenze del DNA complementari al primer sono vicine ed orientate in maniera opposta, si avvia l'amplificazione del locus RAPD. Il risultato è l'ottenimento di una serie di frammenti (bande) caratteristici di un dato ceppo (Alfonso *et al.*, 2000; Paffetti *et al.*, 1995). Ovviamente tanto maggiore è il numero di bande non condivise (bande polimorfiche) tanto maggiore sarà la distanza genetica tra gli isolati analizzati. Il limite di questa tecnica risiede in una certa variabilità dei profili RAPD ed una scarsa ripetibilità dei risultati ottenuti da diversi laboratori. Nonostante questo, l'esame dei vari profili, analizzati nelle stesse condizioni, rende possibile il monitoraggio dei ceppi microbici presenti all'interno di un ecosistema (Williams *et al.*, 1990).

La Rep-PCR (Repetitive DNA-PCR) consiste nell'amplificazione di sequenze ripetute presenti nel DNA di batteri Gram negativi e Gram positivi (Lupski e Weinstock, 1992). L'acronimo Rep indica in modo generico la tecnica, ma nello specifico sono presenti diverse famiglie di sequenze ripetute. Ognuna di queste viene analizzata mediante l'uso di opportuni primer, che conferiscono il nome alla PCR effettuata. Le tre famiglie di sequenze ripetute maggiormente studiate sono le sequenze REP (Repetitive Extragenic Palindromic), le sequenze ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e gli elementi BOX (Versalovic *et al.*, 1994). In funzione delle distanze e della localizzazione fisica degli elementi ripetuti nel genoma, ogni isolato restituirà un profilo specifico costituito da una serie di bande. Adiguzel (2006) ha valutato l'efficacia della tecnica verificando che, tra tutti i primer testati, BOX A1R e (GTG)₅ sono quelli che forniscono una più ampia

differenziazione inter ed intraspecifica fra i batteri appartenenti ai generi *Geobacillus*, *Anoxybacillus* e *Bacillus*.

Nel presente lavoro di ricerca, tutti i profili ottenuti mediante le suddette tecniche sono stati utilizzati in un approccio polifasico sia per il raggruppamento, che per l'identificazione dei microrganismi isolati.

1.6.3 - Metodologia non colturale: applicazione e vantaggi

I suddetti metodi per l'analisi del complesso microbiota del miele non possono prescindere dall'isolamento e dalla coltura in piastra dei microrganismi riscontrati, dai quali estrarre il DNA destinato all'analisi molecolare. Tale approccio colturale, però non è sempre in grado di fornire un quadro completo ed esaustivo della popolazione microbica. Tale limite è dovuto principalmente ai seguenti fattori:

- impossibilità di riprodurre in vitro le condizioni necessarie allo sviluppo delle varie specie e/o ceppi microbici presenti nel campione oggetto di studio;
- fenomeni di quorum-sensing che impediscono a colonie della stessa specie di proliferare ulteriormente una volta raggiunta una densità limite;
- fenomeni di simbiosi che rendono impossibile lo sviluppo di una specie in assenza di co-colture che forniscano metaboliti essenziali alla sua crescita.

La tecnica tradizionale implica quindi una stima in difetto (sia qualitativa che quantitativa) in particolar modo per le specie sottodominanti, presenti in quantità inferiore rispetto alle specie principali, ma comunque con un ruolo ecologico e metabolico ben definito. Tale limitazione oggi può essere superata mediante il

ricorso a metodi non colturali. Questi analizzano complessivamente gli acidi nucleici del campione oggetto di studio, “fotografando” il microbiota presente, senza la necessità di preliminari isolamenti su substrati specifici.

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), introdotta da Muyzer (1993) come mezzo di studio delle comunità microbiche, è oggi una delle metodologie coltura-indipendenti maggiormente utilizzate nei laboratori di tutto il mondo. Dal 1999 la tecnica è stata applicata anche ai campioni alimentari (Ampe *et al.*, 1999), ma mai prima d’ora sul miele. Il suo principale vantaggio risiede nella possibilità di analizzare con tempi e costi relativamente ridotti una grande varietà di campioni, ottenendo informazioni quali-quantitative sulla popolazione microbica presente (Muyzer 1993). Molti studi inoltre ne hanno verificato la capacità di rilevare la presenza di microrganismi non coltivabili e quindi non individuabili con i tradizionali metodi colturali d’identificazione microbica (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Head *et al.*, 1997; Rappe *et al.*, 2003). Come suggerisce lo stesso acronimo, la DGGE consente di separare frammenti di DNA, aventi la stessa lunghezza ma sequenze differenti, mediante una corsa elettroforetica su gel di acrilamide con un gradiente crescente di denaturanti (urea e formamide). Il frammento da analizzare viene ottenuto da un’amplificazione PCR, nella quale si utilizza un primer forward prolungato all’estremità 5’ con una catena di circa 40 basi di guanina e citosina. Questa cosiddetta GC-clamp, sarà quindi integrata in ogni amplicone ed influenzerà la successiva corsa elettroforetica. La separazione delle bande su gel di acrilamide si basa, infatti, sulla maggiore stabilità del triplo legame idrogeno che lega le due basi guanina-citosina (G-C), rispetto al doppio legame che unisce adenina e timina (A-T).

In generale i frammenti più ricchi di basi G-C tendono a mantenere la struttura a doppia elica e migrano più facilmente all'interno del gel, almeno fin quando non venga raggiunta la percentuale critica di denaturanti. In questa situazione i legami più fragili iniziano a rompersi e la doppia elica di DNA comincia a denaturarsi, allargandosi e rallentando la sua corsa fino ad arrestarsi (Fisher e Lerman, 1980). La concentrazione di agenti denaturanti necessaria per l'apertura della doppia elica sarà quindi dipendente dalla sequenza di basi del frammento analizzato. Quanto più saranno vicine e numerose le coppie di basi guanina e citosina, tanto maggiore sarà la percentuale di urea e formamide necessaria per la denaturazione. Per consentire una risoluzione ottimale è essenziale però che le molecole non vengano denaturate completamente. L'aggiunta del GC-clamp, con la sua notevole forza di legame, impedisce la separazione completa dell'amplicone, evitando che le singole eliche migrino fuori dal gel. La DGGE riesce così a separare frammenti con sequenze differenti anche per un solo nucleotide, ottenendo da ogni campione ambientale un diverso fingerprinting costituito da più bande disposte a diversa altezza. Ognuna di queste bande corrisponde ad una sequenza specifica e rivela quindi la presenza di un determinato microrganismo. Sarà poi sufficiente tagliare la banda, contenente l'amplicone interessato, riamplicarlo e sequenziarlo per consentire l'identificazione della specie di appartenenza. La tecnica però permette anche di confrontare il fingerprinting rappresentativo della popolazione microbica di uno specifico campione con quello di altri campioni per evidenziare eventuali analogie o differenze nelle rispettive biocenosi.

CAPITOLO 2 - SCOPI DEL LAVORO

Il miele, principale prodotto apistico, è caratterizzato da una stretta relazione con l'agro-ecosistema da cui deriva. La sua composizione originaria riflette la complessità dei fattori topografici, climatici, pedologici ed antropici di un'area ricadente in una superficie di circa 7 km² intorno all'apiario. Le api, infatti, nella loro incessante attività bottinatrice, effettuano continui micro-prelievi, attuando un involontario quanto efficace campionamento dell'area di foraggiamento. Il continuo contatto con la flora circostante e con le fonti di approvvigionamento idrico causa una contaminazione microbica primaria difficilmente controllabile con il ricorso alle normali pratiche apistiche e che rappresenta quindi una caratteristica intrinseca del prodotto finale.

Gli studi finora realizzati sulla microfauna del miele presuppongono l'isolamento e l'accrescimento dei microrganismi su substrati specifici (Iurlina e Fritz, 2005), ma ciò inevitabilmente esclude la possibilità di individuare organismi vitali presenti, ma non coltivabili. Questo limite può essere superato impiegando metodologie di analisi coltura-indipendenti che analizzano direttamente gli acidi nucleici totali del microbiota presente nel campione ambientale oggetto di studio. Su questi presupposti si muove la nostra ricerca con l'intento di studiare, sia attraverso metodi colturali che non colturali, la biocenosi di mieli di diversa origine, al fine di indagare sia sull'aspetto igienico-sanitario che su un'eventuale correlazione tra l'origine del prodotto e la microfauna riscontrata. Tale correlazione rappresenterebbe, infatti, una nuova possibilità di verifica dell'originalità del prodotto, fattore imprescindibile per qualsiasi politica di valorizzazione.

CAPITOLO 3 - ANALISI DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RICORRENTI NEL MIELE MEDIANTE APPROCCIO COLTURALE

3.1 - MATERIALI E METODI

3.1.1 - Raccolta dei campioni

Le analisi sono state condotte utilizzando un totale di 38 mieli artigianali provenienti da diverse aree geografiche della Sicilia e della Campania. Nel campionamento si è optato non solo per i mieli di nettare (sia uniflorali che millefiori), ma anche per l'introduzione di mieli di melata, prodotto meno affrontato nella ricerca scientifica e dalla biocenosi probabilmente più complessa. Tutti i campioni sono stati prelevati direttamente presso le aziende apistiche, senza essere sottoposti ad alcuna manipolazione (trattamenti termici ad alta temperatura, filtrazioni, miscele di mieli differenti). Una volta trasportati presso i laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali dell'Università di Palermo, la conservazione è avvenuta al buio a 10 °C fino al momento delle successive analisi. Nessun campione mostrava segni di alterazione al momento delle prove.

3.1.2 - Inoculazione

Preparazione dei campioni

L'apertura delle confezioni è avvenuta operando sotto cappa a flusso laminare. Ogni campione è stato accuratamente mescolato con l'ausilio di pipette sterili e da esso sono stati prelevati 50 g, divisi in due aliquote (25 g ciascuna). La prima, destinata alla conta dei microrganismi osmofili, è stata diluita in una soluzione al 30% (p/v) di

glucosio (rapporto campione diluente 1:9), seguendo le indicazioni riportate da ISO 21527-2:2008 al fine di evitare lo shock osmotico e recuperare le cellule danneggiate in modo sub-letale. In tutti gli altri casi, la diluizione è stata effettuata in acqua peptonata (10 g/l) sterilizzata con un rapporto campione/diluente di 1:9. L'omogeneizzazione è stata ottenuta mediante BagMixer 400 (Interscience, Saint Nom, France) settando lo strumento alla massima velocità per 2 minuti.

Preparazione dei substrati e condizioni di incubazione

I diversi gruppi microbici sono stati inoculati su 8 diversi substrati, con diverse condizioni di incubazione riportate nella seguente tabella.

Tab. 4. Substrati e tempi di inoculazione per la realizzazione delle conte microbiche.

Gruppi microbici	Substrato	Condizioni di incubazione	Riferimento bibliografico	
BATTERI	Batteri totali	PCA (Plate Count Agar)	Aerobiosi 3gg a 30°C	
	Batteri osmofili	DWA-b (De Whalley Agar per batteri)	Aerobiosi 5gg a 25°C	(Justè <i>et al.</i> , 2008)
	Batteri lattici	GM17 (M17 + Glucosio)	Anaerobiosi 3gg a 30°C	
	Enterobacteriaceae	VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar)	Anaerobiosi 1g a 37°C	
	<i>Clostridium</i> spp.	RCM (Reinforced Costridium Medium)	Anaerobiosi 7gg a 37°C	(FDA BAM, 2006)
LIEVITI	Lieviti totali	TGY (Tryptone, Glucosio estratto di Lievito)	Aerobiosi 7gg a 25°C	(Senses ed Ozbas, 2006)
	Lieviti osmofili	DWA-l (De Whalley Agar per lieviti)	Aerobiosi 7gg a 25°C	(Justè <i>et al.</i> , 2008)
FUNGHI FILAMENTOSI	PDA (Potato Dextrose Agar)	Aerobiosi 21gg a 25°C		

Il PCA ed il VRBGA sono stati allestiti utilizzando solo il substrato commerciale, mentre gli altri sono stati preparati in laboratorio in base alle indicazioni di seguito riportate:

GM17

Soluzione 1

M17 in polvere	37,25 g
Agar	18 g
Acqua sterile	portare a 300 ml

Soluzione 2

Glucosio	100 g
Acqua sterile	portare a 700 ml

DWA

Soluzione 1

Estratto di lievito	5 g
Caseina	2 g
Amido	2 g
Glicerolo	1 ml
Cloruro di ammonio	2 g
Agar	18 g
Acqua sterile	portare a 300 ml

Soluzione 2

Glucosio	20 g
Saccarosio	400 g
Acqua sterile	portare a 700 ml

TGY

Soluzione 1

Estratto di lievito	5 g
Triptone	5 g
Amido	2 g
Agar	18 g
Acqua sterile	portare a 300 ml

Soluzione 2

Glucosio	100 g
Acqua sterile	portare a 700 ml

PDA

Soluzione 1

PDA in polvere	39 g
Acqua sterile	portare a 300 ml

Soluzione 2	
Glucosio	100 g
Acqua sterile	portare a 700 ml

RCM

Tryptone	5 g
Peptone batteriologico	5 g
Lab-Lemco	10 g
Estratto di lievito	3 g
Destrosio	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Amido	1 g
Cisteina cloridrato	0,5 g
Acetato di sodio	3 g
Lattato di sodio	14 ml
Acqua sterile	portare a 1000 ml

La sterilizzazione è stata effettuata a 121 °C per 20 minuti, ma nel caso dei substrati che prevedevano due soluzioni, queste sono state sterilizzate separatamente e mescolate sotto cappa solo a raffreddamento avvenuto (circa 55 °C). In questa fase i substrati utilizzati per la conta batterica (ad eccezione del VRBGA e del RCM) sono stati addizionati con cicloeximide (170 ppm) e byphenyl (1 g/l) per inibire lo sviluppo di funghi e lieviti; viceversa i substrati utilizzati per funghi e lieviti sono stati addizionati con cloramfenicolo (0,1 g/l). Il tutto e le diluizioni sono state quindi inoculate sui vari mezzi di accrescimento. Tutti i terreni di base sono stati acquistati presso la Oxoid ed i prodotti chimici presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Le condizioni di anaerobiosi sono state ottenute disponendo le piastre in apposite giare per anaerobiosi. Ogni inoculo è stato replicato tre volte.

3.1.3 - Conte microbiche

L'incidenza sui campioni dei diversi gruppi microbici è stata valutata mediante conta diretta su piastra. Unica eccezione i clostridi, per i quali è stata effettuata una stima con la tecnica 3x3 Most Probable Number (MPN). Il metodo si basa sulla probabilità di rilevare lo sviluppo di clostridi in una coltura effettuata su terreno selettivo RCM (Reinforced Clostridium Medium). Per ogni campione sono state allestite 5 diluizioni, successivamente riscaldate a bagnomaria ad 85°C per 15 minuti per inattivare eventuali forme vegetative. In seguito in ogni tubo contenente 9 ml di RCM (precedentemente sterilizzato) è stato aggiunto 1 ml di diluizione, ricoprendo il tutto con 3 ml di agar-acqua al 2% in modo da creare un ambiente anaerobico perfettamente sigillato. Le diluizioni sono state incubate a 37 °C per 7 giorni e controllate quotidianamente, annotando per ogni campione l'eventuale innalzamento del tappo in agar (tubi positivi), chiaro sintomo della produzione di CO₂ e dello sviluppo microbico. Il numero delle prove positive per ogni serie di diluizioni costituisce un codice numerico che ha permesso di risalire al numero più probabile di microrganismi per unità di volume, mediante confronto con le tavole indicate nel protocollo FDA BAM, 2006.

3.1.4 - Raggruppamento fenotipico degli isolati

Batteri: escludendo i presunti *Clostridium* spp., per i quali è stata effettuata solo un'analisi quantitativa, per ogni piastra sono state isolate 1-2 colonie di diversa morfologia (5 nel caso di gruppi morfologici più numerosi). Queste, sono state prima

purificate attraverso successive subculture sui corrispondenti substrati di conteggio e poi sottoposte ad una preliminare caratterizzazione fenotipica, basata su: morfologia delle cellule, test di Gram e della catalasi. Per l'osservazione microscopica, ciascun isolato è stato prelevato sterilmente e stemperato in una goccia di acqua distillata posta su di un vetrino portaoggetti. Dopo l'aggiunta del vetrino copri-oggetto, l'osservazione è stata effettuata mediante microscopio Olympus BX60 con obiettivo 100x immerso in olio di cedro.

Il saggio di Gram è stato eseguito mediante il metodo di Gregersen (1978), che si basa sulla diversa composizione chimica della parete cellulare dei batteri. I batteri Gram positivi presentano, infatti, una parete più semplice dei batteri Gram negativi, nei quali si riscontra esternamente una membrana fosfolipidica. Questa reagisce in presenza di KOH al 3% (v/v) con la formazione di un'evidente viscosità, consentendo così la differenziazione dei due gruppi batterici.

Il test della catalasi è stato realizzato aggiungendo una goccia di soluzione di H₂O₂ al 5% (v/v) ad una colonia precedentemente purificata su piastra e trasferita con un'ansa sterile su un vetrino portaoggetti. L'enzima catalasi determina la detossificazione del perossido di idrogeno, che viene trasformato in acqua ed ossigeno. Nei batteri catalasi positivi si osserva quindi un'effervescenza dovuta alla produzione di O₂.

L'analisi fenotipica ha evidenziato la presenza di nove batteri Gram negativi, riscontrati in due campioni (Miel 28 e Miel 34). Visto il numero esiguo di colonie appartenenti a questo gruppo e morfologicamente identiche tra loro, si è optato per la scelta di due isolati (uno per ogni campione di miele) da destinarsi direttamente alle

successive fasi di studio. Gli altri batteri Gram positivi, invece, sono stati sottoposti ad ulteriori indagini biochimiche.

I bastoncelli Gram positivi e catalasi positivi, sono stati ulteriormente testati per: capacità di sporulazione, crescita a 50 °C, crescita a 65 °C, crescita in presenza del 7% di NaCl, riduzione dei nitrati, idrolisi dell'amido e test di Voges-Proskauer (Tallent *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 1973).

Il primo test è stato effettuato mediante diluizione dei campioni (1:10) in soluzione Ringer e trattamento ad 85 °C per 15 min. per distruggere le cellule vegetative. Questo trattamento è stato seguito dal trasferimento di 0,1 ml di diluizione su Nutrient Agar (NA) ed incubazione per 48 h a 32 °C, al fine di verificare la capacità di accrescimento di nuove colonie a partire dalle spore. Per il test dei nitrati gli isolati sono stati incubati a 35 °C per 24 h in tubi contenenti 5 ml di un substrato così composto:

Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
KNO ₃	1 g
Acqua distillata	1 l
pH 7	
Sterilizzazione a 121 °C per 20 min	

Ad ogni tubo sono stati quindi aggiunti 0,25 ml del reagente A (1 g di acido sulfanilico in 125 ml di acido acetico 5 N) e del reagente B (1 g di α -naftolo in 200 ml di acido acetico 5 N). Il test è stato considerato positivo in caso di comparsa del colore arancio. Infine per l'ultimo test gli isolati sono stati incubati per 48 h a 35 °C in tubi contenenti 5 ml di substrato di Voges-Proskauer modificato:

Peptone	7 g
Cloruro di sodio	5 g

Destrosio	5 g
Acqua distillata	1 l
pH 6,5	
Sterilizzazione a 121 °C per 20 min	

La verifica è stata eseguita aggiungendo 0,6 ml di soluzione A (5 g di α -naftolo in 100 ml di alcool assoluto) e 0,2 ml della soluzione B (40 g di idrossido di potassio da portare a 100 ml con acqua distillata). Il test è considerato positivo in caso di viraggio di colore verso il violetto.

I cocci Gram positivi catalasi negativi, sono stati ulteriormente testati per: capacità di produzione di CO₂ dal glucosio, capacità di sviluppo in presenza di pentosi, accrescimento a 15 °C, accrescimento a 45 °C, accrescimento a pH 9,2, accrescimento in presenza del 6,5% di NaCl. Il primo test è stato effettuato su M17 in assenza di citrati, che fermentando possono causare la formazione dei gas (Parente e Cogan, 2004). Il lattosio è stato sostituito con il glucosio ed i tubi di saggio sigillati con un tappo di 3 ml di agar-acqua al 2%. I ceppi eterofermentanti obbligati, capaci quindi di provocare l'innalzamento del tappo in agar-acqua per la formazione della CO₂, sono stati considerati positivi. Infine per saggiare la capacità di sviluppo in presenza di pentosi sono stati utilizzati dei tubi contenenti una miscela di xylosio, arabinosio e ribosio (8 g/l per ogni pentoso) al posto del glucosio. Ciò ha consentito di differenziare i ceppi omofermentanti facoltativi (ceppi positivi al test) da quelli omofermentanti obbligati (negativi al test).

L'insieme dei risultati ottenuti ha permesso di suddividere ulteriormente i cocci ed i bacilli Gram positivi in diversi sottogruppi. Da ogni sottogruppo sono stati scelti il 40% circa degli isolati, da destinare alle successive analisi molecolari. Tutti gli

isolati prescelti sono stati trasferiti sul corrispondente substrato liquido, con l'aggiunta di glicerolo al 30% e conservati a -80 °C fino al momento delle successive analisi molecolari.

Funghi filamentosi e lieviti: il raggruppamento fenotipico di funghi e lieviti è stato effettuato mediante analisi micro e macroscopica degli isolati. Le colonie fungine allevate su PDA sono state osservate ad intervalli giornalieri ed, una volta raggiunto il diametro di circa 2 mm, trasferite su una nuova piastra Petri contenente il medesimo substrato. Ad accrescimento avvenuto sono state analizzate microscopicamente e confrontate con i manuali (Barnett ed Hunter, 1998; Domsh *et al.*, 2007) annotandone anche tessitura, pigmentazione, presenza di essudati e velocità di accrescimento. Gli isolati blastomicetici e fungini con morfologie differenti sono stati suddivisi in gruppi. Per ogni piastra sono stati quindi selezionati cinque isolati per gruppo (1-2 per quelli meno numerosi), da sottoporre alle successive analisi. La preparazione e lo stoccaggio degli isolati, in attesa della successiva caratterizzazione molecolare, sono stati eseguiti mediante le tecniche già riportate per i batteri.

3.1.5 - Caratterizzazione genotipica degli isolati

Batteri: il DNA genomico è stato ottenuto, dopo crescita overnight, partendo dalle colonie degli isolati prescelti. Le cellule sono state prelevate dalla brodo-coltura e dopo centrifugazione a 10000xg per 5 min., i pellet ottenuti sono stati risospesi in 1 ml di H₂O distillata sterile. L'estrazione è stata effettuata mediante Instagene Matrix

kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguendo le indicazioni riportate dal produttore. Tutti i batteri Gram positivi, sia cocci che bastoncelli, sono stati sottoposti ad analisi RAPD con primer M13 (GAGGGTGGCGGTTCT) (Stenlid *et al.*, 1994) sulla base del protocollo suggerito da Zapparoli *et al.* (1998). In un volume finale di 25 µl sono stati aggiunti Buffer 1 x; 2,5 mM di MgCl₂; 0,2 mM di dNTP mix; 2 µM di primer, 0,624 U di Taq e 62,5 ng di DNA templatato. Il programma impostato sul termociclatore prevede: una denaturazione iniziale a 94 °C per 2 min., 40 cicli di 94 °C per 1 min., 42 °C per 20 sec., 72 °C per 2 min. ed un allungamento finale a 72 °C per 10 min.

I soli bastoncelli Gram positivi, catalasi positivi sono stati ulteriormente analizzati mediante due differenti Rep-PCR, utilizzando i primer:

- (GTG)₅(GTGGTGGTGGTGGTG)
- BOX A1R (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG)

sulla base del protocollo suggerito da Adiguzel *et al.*, (2009). In un volume finale di 30 µl sono stati aggiunti: 50 ng di DNA templatato; 2,5 µl di dimetilsolfossido (DMSO); 5 µl di Buffer specifico Gitschier; 1,25 µl di siero albumina bovina (soluzione iniziale 20 mg/ml); 3 µl di primer (5 µM); 0,3 µl di Taq polymerasi. I profili termici impostati sul termociclatore prevedono: una denaturazione iniziale di 95 °C per 7 min. (94 °C per 7 min. per la REP-PCR); 30 cicli a 95 °C per 1 min. (30 sec. per la REP-PCR), 45 °C per 1 min., 65 °C per 8 min. ed un'estensione finale a 65 °C per 15 min.

Tutte le amplificazioni sono state eseguite mediante termociclatore T1 (Biometra, Göttingen, Germania); le corse elettroforetiche sono state realizzate a 100 V su gel di agarosio 1,5% (p/v) in Buffer TBE 1 x con la seguente composizione:

Tris Base	12,11 g
Acido Borico	61,8 g
EDTA	7,4 g
pH 8,3 con NaOH	
Acqua distillata	portare ad 1 l
Sterilizzazione a 121°C per 20 min	

Il SYBR[®] safe DNA gel stain (Life Technologies) è stato addizionato direttamente al gel di agarosio (1 µl/10 ml di gel agarosio) prima della solidificazione. Le bande sono state visualizzate attraverso transilluminatore UV ed acquisite mediante Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System (BioRad, Richmond, USA). L'altezza delle bande è stata confrontata in riferimento ai marker GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

Il confronto dei patterns è stato realizzato mediante il software Gelcompare versione 6.5 (Applied-Maths, Sin Marten Latem, Belgium) impiegato sia per l'analisi dei profili M13 che per quella combinata dei profili BOX-PCR e REP-PCR. La cluster analysis è stata effettuata utilizzando il coefficiente di similarità proposto da Dice (1945) e l'algoritmo di clusterizzazione UPGMA (Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Means) con una tolleranza tra le bande del 2%.

Ciò ha consentito di ottenere il raggruppamento molecolare dei diversi gruppi batterici, permettendo di selezionare i ceppi più rappresentativi da sottoporre a PCR mediante i primer universali:

- fD1 (CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

- rD1 (CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC)

capaci di amplificare il gene 16S rRNA di una grande varietà di taxa batterici (Weisburg *et al.*, 1991). In un volume finale di 30 µl sono stati aggiunti 62,5 ng di DNA; Buffer 1 x; 20 mM di MgCl₂; 0,25 mM di dNTP mix; 0,2 µM di ciascun primer e 1,5 U di Taq polimerasi. Nel programma del termociclatore la denaturazione iniziale a 95 °C per 3 min. è seguita da 30 cicli a 94 °C per 1 min., 54 °C per 45 sec., 72 °C per 2 min. ed un allungamento finale a 72 °C per 7 min.

Gli ampliconi sono stati purificati mediante QIA-quick purification kit (Quiagen S.p.a., Milan, Italy) ed inviati alla Primm Biothech S.r.l. (Milano, Italia) per il sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state quindi confrontate con il data base NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://ncbi.nlm.nih.gov>) mediante algoritmo BlastN. Il metodo però non ha consentito un'identificazione univoca per molti dei ceppi analizzati e si è optato quindi per un'ulteriore analisi RFLP mediante digestione enzimatica con le endonucleasi *RsaI*, *CfoI* e *HinfI* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) a 37 °C per 8 h. I profili ottenuti sono stati confrontati con quelli proposti da Jeyaram *et al.* (2011), permettendo così l'identificazione finale a livello di specie.

Lieviti: l'estrazione del DNA è stata realizzata col metodo già applicato per i batteri ed il template ottenuto amplificato per il gene 5.8S rRNA (Fig.3) circondato da 2 frammenti nucleotidici non trascritti.

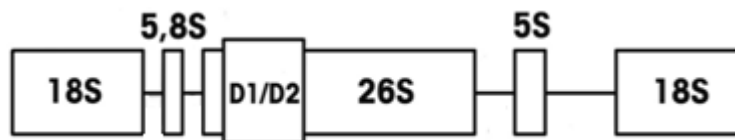


Fig. 3. Rappresentazione delle subunità ribosomiali

Il protocollo utilizzato prevede l'uso dei due primer:

- ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG);
- ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

In un volume complessivo di 20 μ l sono stati aggiunti Buffer 1 x; $MgCl_2$ 25 mM; dNTP mix 0,25 mM; 0,25 μ M per ciascun primer, 0,3 U di Taq polimerasi. Il programma di amplificazione comprende una denaturazione iniziale a 95 °C per 5 min.; seguita da 35 cicli a 94 °C per 1 min., 55 °C per 2 min., 72 °C per 2 min. ed un'estensione finale a 72 °C per 10 min.

Gli ampliconi ottenuti sono stati successivamente sottoposti ad analisi RFLP ricorrendo alle endonucleasi *CfoI*, *HaeIII* ed *HinfI* (MBI Fermentas), sulla base delle esperienze di Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Questi, infatti, hanno utilizzato la medesima tecnica per l'analisi dei lieviti vinari dimostrando che la digestione della regione 5.8S rRNA è un strumento rapido ed efficiente per misurare le strette relazioni inter ed intraspecifiche fra diverse specie di lieviti ascrivibili e non al genere *Saccharomyces*.

L'analisi dei fingerprinting ottenuti ha consentito la suddivisione molecolare dei diversi ceppi e la scelta degli isolati da amplificare per la regione D1/D2 del gene 26S rRNA, una regione altamente conservata considerata idonea per la differenziazione dei lieviti a livello di specie (Kurtzman *et al.*, 1998, 2003). Sulla base del protocollo da essi proposto, la PCR è stata effettuata utilizzando i primer:

- NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG);
- NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG).

In un volume finale di 30 µl sono stati aggiunti Buffer 1 x; MgCl₂ 20 mM; dNTP mix 0,3 mM; 0,2 µM per ciascun primer, 1,5 U di Taq polimerasi. Il programma di amplificazione comprende una denaturazione iniziale a 95 °C per 5 min.; 30 cicli a 95 °C per 1 min., 52 °C per 45 sec., 72 °C per 1 min. ed un'estensione finale a 72 °C per 7 min.

Gli ampliconi ottenuti sono stati infine inviati alla Prim Biotech (Milano, Italia) ed i risultati confrontati mediante BlastN con la banca dati NCBI. Tutti i prodotti di PCR ed RFLP sono stati analizzati e visualizzati come già riportato per i batteri.

Funghi filamentosi: il DNA è stato estratto dalle singole colture mediante protocollo CTAB (cetyl-trimethylammonium-bromide) come riportato da O'Donnell *et al.* (1998). Il templatò è stato amplificato con la coppia di primer proposti da Gardes e Bruns (1993) sulla base del protocollo suggerito da White *et al.* (1990):

- ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA);
- ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC).

In un volume finale di 40 µl sono stati aggiunti 300 ng di DNA Buffer 1 x; MgCl₂ 20 mM; dNTP mix 0,5 mM; 0,25 µM per ciascun primer, 2,5 U di Taq polimerasi. Il programma di amplificazione comprende una denaturazione iniziale a 95 °C per 2 min.; 30 cicli a 95 °C per 30 sec., 55 °C per 20 sec., 72 °C per 1 min. ed un allungamento finale a 72 °C per 5 min. Gli ampliconi ottenuti sono stati quindi sottoposti ad analisi RFLP con le endonucleasi *CfoI* e *HaeIII* (MBI Fermentas) per consentirne una suddivisione in gruppi omogenei. Tutti i prodotti di PCR e delle

RFLP sono stati analizzati, visualizzati e acquisiti come già riportato per i precedenti gruppi microbici. Un isolato per gruppo è stato quindi selezionato, sequenziato per la regione 5.8S ITS rRNA ed identificato a livello di specie per confronto con il database NCBI.

3.1.6 - Calcolo degli indici di biodiversità microbica

I risultati ottenuti, mediante le precedenti analisi, hanno reso evidente la distribuzione delle diverse specie microbiche nei campioni analizzati e consentito la valutazione della biodiversità mediante tre diversi indicatori. Il calcolo degli indici di ricchezza genotipica di Margalef (R), di diversità di Shannon-Weaver (H') e di dominanza di Simpson (D) è stato eseguito utilizzando le formule indicate da Ventorino *et al.* (2007) e riportate in tabella.

Tab. 5. Indici di biodiversità.

Indice	Formula	Parametri
Indice di ricchezza genotipica di Margalef	$R = S - 1 / \ln N$	S= numero di genotipi N= numero di isolati collezionati
Indice di diversità di Shannon-Weaver	$H' = -\sum P_i \ln P_i$	P= abbondanza relativa di ogni specie calcolata secondo l'equazione $P_i = n_i / N$, dove n_i è il numero di ogni genotipo e N è il numero totale dei genotipi
Indice di dominanza di Simpson	$D = \sum P_i^2$	

3.2 - RISULTATI

3.2.1 - Conte microbiche

I risultati delle conte dei diversi gruppi microbici analizzati sono riportati nella tabella 6. Con l'eccezione del campione Miel 36, i valori più alti ottenuti per i batteri sono stati riscontrati su PCA. L'86,8% dei campioni ha sviluppato colonie su questo substrato, anche se il numero medio si attesta su valori piuttosto bassi, con punte che raramente superano le 100 colonie per piastra (Miel 26, Miel 28). Dodici campioni (il 31,5% del totale) hanno evidenziato la presenza di batteri lattici su GM17 con valori medi compresi tra 1 e 88 colonie per piastra; mentre la tecnica MPN ha dato esito positivo in 15 campioni (39,5%) raggiungendo solo in due casi (Miel 13 e Miel 23) il valore massimo stimato di 0,92 colonie per ml di miele. Infine solo due campioni (Miel 28 e Miel 34) sono risultati positivi alla presenza di Enterobacteriaceae su VRBGA, mentre nessuna colonia batterica si è accresciuta sul substrato allestito per ospitare i batteri osmofili (DWA-b). La presenza di lieviti è stata riscontrata in 23 casi, pari al 60,5% del totale, con un'incidenza più alta sul substrato più ricco in zuccheri (DWA-1). Il 68,4% dei campioni infine ha evidenziato la presenza di funghi filamentosi con un valore massimo di 27 UFC/ml ottenuto dal campione Miel 6 (millefiori).

Tab. 6. Carica microbica media (UFC/ml) ± D.S dei campioni di miele di diversa origine botanica e territoriale.

Codice campione	Origine botanica	Luogo di campionamento	Media ± D.S.							
			PCA	GM17	DWA-b	VRBGA	RCM	TGY	DWA-I	PDA
Miel 01	Nespolo	Ciaculli (Pa)	7,00·10 ⁰ ±2,83·10 ⁰	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	0,36	5,42·10 ³ ±8,82·10 ²	1,86·10 ⁴ ±1,79·10 ³	-
Miel 02	Millefiori	Belmonte Mezzagno (Pa)	3,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	-	-	-	00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	3,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰
Miel 03	Millefiori	Naro (Ag)	-	-	-	-	0,36	2,55·10 ² ±1,77·10 ¹	2,90·10 ² ±4,52·10 ¹	2,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰
Miel 04	Agrumi	Sciacca (Ag)	-	-	-	-	-	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	4,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 05	Millefiori	Trabia (Pa)	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	0,36	-	-	5,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 06	Millefiori	Trabia (Pa)	4,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	-	-	2,70·10 ¹ ±4,24·10 ⁰
Miel 07	Agrumi	Bolognetta (Pa)	4,70·10 ¹ ±1,84·10 ¹	-	-	-	0,36	4,76·10 ² ±6,51·10 ¹	1,21·10 ² ±2,97·10 ¹	5,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰
Miel 08	Millefiori	Belmonte Mezzagno (Pa)	6,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	-	-	-	-	2,00·10 ¹ ±1,41·10 ⁰	2,30·10 ² ±2,83·10 ⁰	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰
Miel 09	Sulla	Santa Cristina (Pa)	3,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	-	0,36	5,50·10 ² ±2,12·10 ⁰	2,16·10 ² ±5,52·10 ¹	2,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 10	Agrumi	Partinico (Pa)	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	-	0,36	8,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	3,61·10 ² ±1,48·10 ¹	5,50·10 ⁰ ±3,54·10 ⁰
Miel 11	Acacia	Caronia (Me)	2,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	-	0,36	-	-	1,05·10 ¹ ±2,12·10 ⁰
Miel 12	Melata	Somma Vesuviana (Na)	3,90·10 ¹ ±1,41·10 ⁰	-	-	-	-	-	-	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰
Miel 13	Melata	Somma Vesuviana (Na)	5,40·10 ¹ ±1,27·10 ¹	-	-	-	0,92	6,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	6,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	-
Miel 14	Melata	Castel di Tusa (Me)	5,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	-	-	-	0,36	-	-	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰
Miel 15	Millefiori	Benevento (Bn)	2,05·10 ¹ ±3,54·10 ⁰	-	-	-	-	6,50·10 ⁰ ±3,54·10 ⁰	3,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	5,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰
Miel 16	Millefiori	Somma Vesuviana (Na)	9,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	0,36	1,75·10 ¹ ±3,54·10 ⁰	2,92·10 ² ±6,15·10 ¹	-
Miel 17	Millefiori	Portici (Na)	7,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	1,56·10 ² ±2,26·10 ¹	3,06·10 ² ±3,68·10 ¹	-
Miel 18	Castagno	Monteforte (Sa)	7,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	0,36	-	-	-
Miel 19	Melata	Somma Vesuviana (Na)	6,40·10 ¹ ±2,82·10 ⁰	1,35·10 ¹ ±2,12·10 ⁰	-	-	0,36	1,90·10 ¹ ±7,07·10 ⁰	5,50·10 ² ±8,49·10 ⁰	-
Miel 20	Melata	Somma Vesuviana (Na)	3,05·10 ¹ ±2,12·10 ⁰	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	0,36	6,35·10 ¹ ±2,33·10 ¹	2,88·10 ² ±4,53·10 ¹	-
Miel 21	Eucalipto	Naro (Ag)	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	4,30·10 ¹ ±1,41·10 ⁰	-
Miel 22	Agrumi	Sciacca (Ag)	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	-	-	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	4,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰
Miel 23	Cardo	Naro (Ag)	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	-	-	0,92	-	-	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 24	Millefiori	Naro (Ag)	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	-	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	2,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 25	Eucalipto	Lercara Friddi (Pa)	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	7,82·10 ² ±3,11·10 ¹	8,74·10 ² ±6,51·10 ¹	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 26	Cardo	Roccapalumba (Pa)	3,18·10 ² ±1,13·10 ⁰	8,80·10 ¹ ±8,48·10 ⁰	-	-	-	1,90·10 ¹ ±5,66·10 ⁰	-	-
Miel 27	Melata	Finale di Pollina (Pa)	1,40·10 ¹ ±4,24·10 ⁰	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	7,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	5,40·10 ² ±8,49·10 ¹	5,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰
Miel 28	Agrumi	Santa Flavia (Pa)	1,08·10 ² ±1,41·10 ¹	1,00·10 ¹ ±2,83·10 ⁰	-	2,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	-	1,65·10 ¹ ±4,95·10 ¹	5,60·10 ¹ ±5,66·10 ⁰	2,20·10 ¹ ±8,49·10 ⁰
Miel 29	Eucalipto	Piana degli Albanesi (Pa)	9,50·10 ⁰ ±3,54·10 ⁰	-	-	-	-	-	-	3,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 30	Millefiori	Castronovo di Sicilia (Pa)	-	-	-	-	-	-	-	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 31	Millefiori	Montemaggiore (Pa)	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	-	-	-
Miel 32	Millefiori	Portella di mare (Pa)	1,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	-	-	3,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 33	Sulla	Balata di Baida (Tp)	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	-	-	-	-	3,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 34	Sulla	Balata di Baida (Tp)	3,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	-	-	2,50·10 ⁰ ±2,14·10 ⁰	0,36	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰	1,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰	4,00·10 ⁰ ±1,41·10 ⁰
Miel 35	Melata	Boscotrecase (Na)	3,55·10 ¹ ±2,12·10 ⁰	6,50·10 ⁰ ±2,12·10 ⁰	-	-	-	7,41·10 ² ±1,27·10 ¹	1,60·10 ³ ±1,48·10 ²	-
Miel 36	Millefiori	Boscotrecase (Na)	8,50·10 ⁰ ±3,54·10 ⁰	2,15·10 ¹ ±2,12·10 ⁰	-	-	-	-	-	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰
Miel 37	Millefiori	Balata di Baida (Tp)	-	-	-	-	-	-	-	-
Miel 38	Eucalipto	Balata di Baida (Tp)	-	-	-	-	-	-	-	2,00·10 ⁰ ±0,00·10 ⁰

3.2.2 - Raggruppamento fenotipico ed identificazione molecolare degli isolati

Batteri: l'esame microscopico, seguito dai test della catalasi, di Gram e di sporulazione ha consentito la suddivisione delle 471 colonie batteriche inizialmente selezionate in tre gruppi. Il primo comprendente 423 bastoncini Gram positivi e catalasi positivi, ascritti presuntivamente al genere *Bacillus*; il secondo gruppo, 39 cocci Gram positivi, considerati come presunti batteri lattici; il terzo 9 bastoncini Gram negativi e catalasi positivi (accresciuti su VRBGA). I due isolati prescelti in quest'ultimo gruppo e direttamente sottoposti a sequenziamento del gene 16S rRNA sono stati entrambi identificati come appartenenti alla specie *Klebsiella pneumoniae* (Acc. No. KC692177, KC692181). I restanti Gram positivi, invece, sono stati sottoposti ad ulteriori test biochimici e di accrescimento. Ciò ha permesso la suddivisione dei presunti batteri lattici e delle presunte Bacillaceae rispettivamente in tre (Tab. 7) e sette sottogruppi (Tab. 8) e la selezione del 40% degli isolati per gruppo da sottoporre alle successive indagini molecolari. La cluster analysis dei profili RAPD di questi ultimi con un livello di similarità dell'80% ha consentito inoltre di suddividere ulteriormente i presunti *Bacillus* spp. in 33 cluster (Fig. 4) ed i presunti batteri lattici in 3 cluster (Fig. 5).

Tab. 7. Caratterizzazione morfologico-biochimica dei presunti batteri lattici.

Caratteristiche	Gruppi		
	A n=28	B n=1	C n=10
Morfologia cellulare	Cocci, tetradi	Cocci, corte catene	Cocci corte catene
Catalasi	-	-	-
Reazione di Gram	+	+	+
Crescita a: 15 °C	+	+	+
45°C	-	-	+
pH 9.2	+	+	+
6,5% NaCl	+	-	+
Produzione di CO ₂ da glucosio	-	-	-
Crescita in presenza di zuccheri	-	-	-

Tab. 8. Caratterizzazione morfologica e biochimica dei batteri sporigeni.

Caratteristiche	Gruppi						
	D (n=198)	E (n=50)	F (n=10)	G (n=68)	H (n=95)	I (n=1)	L (n=1)
Morfologia cellulare	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Produzione di spore	+	+	+	+	+	+	+
Catalasi	+	+	+	+	+	+	+
Reazione di Gram	+	+	+	+	+	+	+
Crescita anaerobica	-	+	+	-	-	+	+
Riduzione dei nitrati	+	+	+	V	-	+	+
Test Voges-Proskauer	+	+	+	-	+	-	+
Idrolisi dell'amido	+	+	+	+	-	+	+
Crescita a: 50 °C	+	-	+	-	+	-	-
65 °C	-	-	-	-	-	-	-
7% NaCl	+	+	+	+	+	+	-

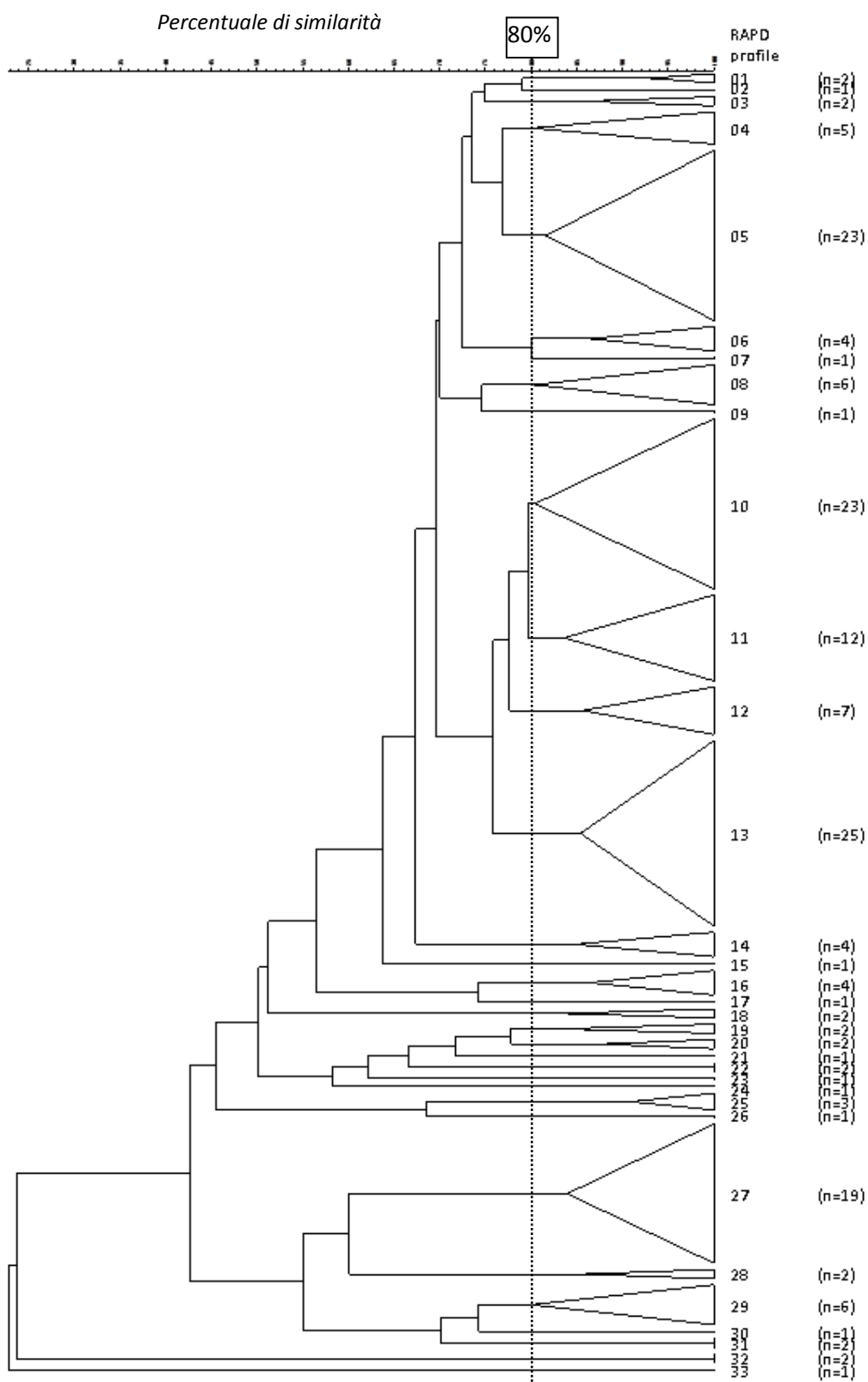


Fig. 4. Dendrogramma dei profili RAPD dei presunti *Bacillus* spp. Tra parentesi il numero degli isolati per cluster.

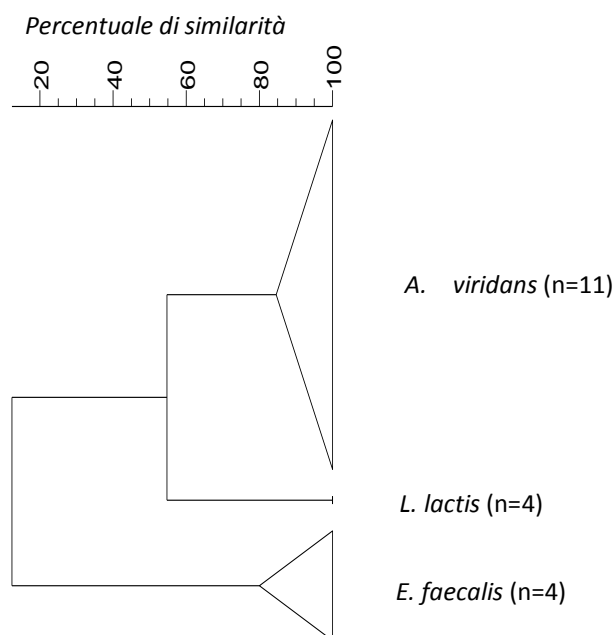


Fig. 5. Dendrogramma dei profili RAPD dei presunti batteri lattici. Tra parentesi il numero degli isolati in ogni cluster.

Nel caso dei presunti lattobacilli un isolato per gruppo è stato selezionato e sequenziato per il gene 16S rRNA, consentendo così l'identificazione a livello di specie (Tab. 9).

Tab. 9. Raggruppamento fenotipico-molecolare dei lattobacilli e loro identificazione.

Gruppo fenotipico	Gruppo RAPD	Specie	Incidenza	Acc. No.
A	I	<i>Aerococcus viridans</i>	3%	KC692208
B	II	<i>Lactococcus lactis</i>	3%	KC692209
C	III	<i>Enterococcus faecalis</i>	8%	KC692178

I *Bacillus* spp. invece sono stati analizzati anche attraverso Rep-PCR e suddivisi in 42 gruppi (Tab. 10) mediante cluster analysis combinata dei profili (GTG)₅ e BOX

A1R e l'integrazione di questi risultati con quelli ottenuti dalla RAPD ha permesso di individuare gli isolati più rappresentati di ogni gruppo da sottoporre a sequenziamento. Il confronto con il database NCBI ha consentito però una identificazione univoca a livello di specie solo per 5 ceppi: *Paenibacillus polymyxa* (ML227), *Bacillus simplex* (ML384), *Bacillus pumilus* (ML374) e *Bacillus licheniformis* (ML103A e ML104B). Negli altri casi il risultato appariva ambiguo e solo l'ulteriore RFLP confrontata con i profili ottenuti con da Jeyaram *et al.* (2011) ha permesso una determinazione certa. Tali isolati sono stati identificati come appartenenti ad 8 differenti specie del genere *Bacillus* (Tab. 10): *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus pumilus*. Il ceppo ML582 è stato determinato solo a livello di genere. Nel complesso tra i batteri sporigeni sono stati individuati 2 generi, 9 specie e 45 ceppi. Nella tabella 11 sono riportati i dati riguardanti l'incidenza sui campioni ed il numero di ceppi riscontrati per ogni singola specie.

Tab. 10. Raggruppamento ed identificazione dei batteri sporigeni.

Codice ceppo	Cluster fenotipico	RAPD cluster	BOX/ (GTG) ₅ cluster	Identificazione tramite sequenziamento del 16S RNA	Identificazione tramite RFLP	Acc. No.
ML101A	E	29	35	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	KC69216
ML101B	D	25	20	<i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i>	<i>B. subtilis</i>	KC69217
ML102B	D	28	41	<i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i>	<i>B. subtilis</i>	KC69219
ML103A	F	32	33	<i>B. licheniformis</i>		KC69219
ML104B	F	18	01	<i>B. licheniformis</i>		KC69218
ML105	H	23	19	<i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69219
ML106A	D	33	10	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69219
ML106B	D	19	28	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69219
ML208	E	29	35	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	KC69219
ML211	H	05	23	<i>B. pumilus</i> / <i>B. altitudinis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69217
ML215	D	01	27	<i>B. subtilis</i> / <i>B. mojavensis</i>	<i>B. subtilis</i>	KC69218
ML227	L	26	34	<i>P. polymyxa</i>		KC69218
ML233	E	05	24	<i>B. thuringiensis</i> / <i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	KC69218
ML235	G	31	11	<i>B. megaterium</i> / <i>B. aryabhatai</i>	<i>B. megaterium</i>	KC69218
ML252	H	05	25	<i>B. pumilus</i> / <i>B. altitudinis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69216
ML254	E	30	36	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	KC69219
ML256	H	05	25	<i>B. pumilus</i> / <i>B. altitudinis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69216
ML257	G	20	12	<i>B. megaterium</i> / <i>B. aryabhatai</i>	<i>B. megaterium</i>	KC69220
ML258	G	22	14	<i>B. megaterium</i> / <i>B. aryabhatai</i>	<i>B. megaterium</i>	KC69216
ML259	E	06	37	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	KC69218
ML265	D	17	03	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69216
ML267	E	05	39	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	KC69216
ML270	H	05	32	<i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69215
ML272	E	15	21	<i>B. cereus</i> / <i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	KC69220
ML274	D	11	06	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69215
ML275	G	21	13	<i>B. megaterium</i> / <i>B. aryabhatai</i>	<i>B. megaterium</i>	KC69220
ML323	D	16	07	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69220
ML345	D	10	03	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69216
ML353	H	04	22	<i>B. pumilus</i> / <i>B. altitudinis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69216
ML361	D	13	05	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69216
ML374	H	03	30	<i>B. pumilus</i>		KC69220
ML376	D	10	40	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69218
ML384	I	11	26	<i>B. simplex</i>		KC69219
ML390	D	09	04	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69219
ML451	D	10	02	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69217
ML456	D	10	08	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69217
ML471	D	02	42	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69220
ML474	D	14	16	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>	KC69219
ML477	H	08	17	<i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69216
ML479	G	20	09	<i>B. megaterium</i> / <i>B. aryabhatai</i>	<i>B. megaterium</i>	KC69220
ML482	G	07	15	<i>B. megaterium</i> / <i>B. aryabhatai</i>	<i>B. megaterium</i>	KC69217
ML484	H	12	31	<i>B. pumilus</i> / <i>B. altitudinis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69217
ML568	H	08	29	<i>B. pumilus</i> / <i>B. altitudinis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69217
ML581	D	10	03	<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	KC69217
ML582	D	27	38	<i>B. amyloliquefaciens</i> / <i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus</i> spp.	KC69218
ML618	H	24	18	<i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i>	<i>B. pumilus</i>	KC69220

Tab. 11. Incidenza dei batteri sporigeni sui campioni analizzati.

Specie	Numero ceppi	Incidenza sui campioni
<i>B. amyloliquefaciens</i>	13	58%
<i>B. pumilus</i>	11	47%
<i>B. megaterium</i>	6	37%
<i>B. cereus</i>	6	21%
<i>B. subtilis</i>	4	16%
<i>B. thuringiensis</i>	1	11%
<i>B. licheniformis</i>	2	5%
<i>B. simplex</i>	1	3%
<i>P. polymyxa</i>	1	3%

Lieviti: sulla base delle differenze morfologiche, 323 isolati sono stati prescelti e sottoposti ad identificazione molecolare. Dopo l'analisi di restrizione della regione 5.8S ITS, questi sono stati suddivisi in nove clusters ed il confronto delle bande con quelle riscontrate in letteratura (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2006) ha consentito una preliminare identificazione degli isolati dei gruppi III e IX come appartenenti alle specie *Debaryomyces hansenii* e *Zygosaccharomyces rouxii*. Il successivo sequenziamento della regione D1/D2 del gene 26S rRNA ha confermato il precedente risultato ed ha permesso di identificare (con una percentuale d'identità maggiore o uguale al 99%) anche i restanti ceppi. Le specie identificate sono *Zygosaccharomyces mellis* per gli isolati inclusi nei gruppi IV, V, VI, VII e VIII; *Aureobasidium pullulans* (gruppo I); *Cryptococcus uzbekistanensis* (gruppo II). Il ceppo appartenente al gruppo IV (*Z. mellis*) è quello maggiormente rappresentato, mentre la più alta biodiversità è stata riscontrata nei campioni Miel 19 e Miel 35, entrambi di melata. I profili di restrizione e l'incidenza dei vari ceppi sono riportati nella tabella 12.

Tab. 12. Raggruppamento, identificazione e distribuzione dei lieviti.

Profilo RFLP	Codice isolato	PCR 5.8S-ITS	Dimensione dei frammenti di restrizione			Specie	Incidenza sui campioni	Acc. No.
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>			
I	ML403	600	200+180+110+60	450+150	300+175+125	<i>Aureobasidium pullulans</i>	3%	KC692229
II	ML114	620	320+300	550+70	350+270	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	5%	KC692227
III	ML294	650	300+300+50	420+150+90	325+325	<i>Debaryomyces hansenii</i>	8%	KC692228
IV	ML463	850	310+240+190+110	590+200+60	400+260+190	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	50%	KC692231
V	ML517	1000	400+390+140	700+160+60	530+260+130	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	3%	KC692230
VI	ML281	900	320+190+130+60	400+270+170+60	490+270+140	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	11%	KC692233
VII	ML343	820	300+220+190+110	820	400+250+170	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	5%	KC692234
VIII	ML534	900	390+360+140	670+170+60	510+260+130	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	16%	KC692235
IX	ML119	750	290+200+170+90	400+210+90	350+260+140	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	3%	KC692232

Funghi filamentosi: nel complesso sono stati selezionati 171 isolati di funghi filamentosi, distinti in 17 gruppi in base all'esame fenotipico. La successiva conferma di tale suddivisione mediante l'analisi di restrizione della regione 5.8S ITS ha confermato il precedente raggruppamento fenotipico (Tab. 13) e ci ha autorizzato alla scelta di un isolato per gruppo da sottoporre a sequenziamento per il gene 5.8S ITS rRNA.

Ciò ha consentito di identificare le seguenti specie con una percentuale d'identità maggiore o uguale al 99%: *Alternaria alternata* (gruppo I), *Aspergillus niger* (gruppo III), *Aspergillus proliferans* (gruppo IV), *Aspergillus spelunceanus* (gruppo V), *Chaetomium globosum* (gruppo VI), *Cladosporium cladosporioides* (gruppo VII), *Daldinia concentrica* (gruppo VIII), *Emericella discophora* (gruppo IX), *Emericella qinqixianii* (gruppo X), *Penicillium corylophilum* (gruppo XII), *Penicillium decumbens* (gruppo XIII), *Penicillium italicum* (gruppo XIV), *Penicillium polonicum* (gruppo XVI) e *Penicillium echinulatum* (gruppo XVII). Per gli altri isolati è stata possibile solo un'identificazione a livello di genere: *Arthrimum* spp. (gruppo II), *Emericella* spp. (gruppo XI) e *Penicillium* spp. (gruppo XV). I campioni Miel 7 (agrumi) e Miel 3, Miel 5 e Miel 15 (millefiori) hanno mostrato la maggiore biodiversità fungina, mentre le specie maggiormente riscontrate sono *P. corylophilum* e *A. niger*. L'incidenza percentuale sui campioni testati è riportata in tabella 13.

Tab. 13. Raggruppamento, identificazione e distribuzione dei funghi filamentosi.

Cluster RFLP	Codice isolato	Specie (% d'identità)	Incidenza	Acc. No.
I	ML356	<i>Alternaria alternata</i> (99)	3%	KC692221
II	ML193	<i>Arthrinium</i> spp. (99)	13%	KC692225
III	ML168B	<i>Aspergillus niger</i> (99)	32%	KC692215
IV	ML280	<i>Aspergillus proliferans</i> (100)	3%	KC692212
V	ML442	<i>Aspergillus spelunceus</i> (99)	3%	KC692218
VI	ML176	<i>Chaetomium globosum</i> (99)	3%	KC692213
VII	ML370	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (99)	3%	KC692219
VIII	ML286	<i>Daldinia concentrica</i> (99)	3%	KC692211
IX	ML297	<i>Emericella discophora</i> (99)	3%	KC692226
X	ML514	<i>Emericella qinqixianii</i> (99)	3%	KC692210
XI	ML488	<i>Emericella</i> spp.(96)	3%	KC692217
XII	ML369	<i>Penicillium corylophilum</i> (99)	50%	KC692220
XIII	ML155	<i>Penicillium decumbens</i> (100)	5%	KC692216
XIV	ML332	<i>Penicillium italicum</i> (99)	5%	KC692222
XV	ML172	<i>Penicillium</i> spp. (95)	3%	KC692214
XVI	ML329	<i>Penicillium polonicum</i> (99)	16%	KC692223
XVII	ML291	<i>Penicillium echinulatum</i> (99)	3%	KC692224

3.2.3 - Biodiversità microbica dei mieli

La tabella 14 mostra la distribuzione dei microrganismi, raggruppati per specie, nei vari campioni e come alcuni di essi (*B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Clostridium* spp., *A. niger*, *P. corylophilum* e *Z. mellis*), probabilmente più adattati a questa particolare matrice, siano riscontrabili in mieli di diversa origine botanica.

Tab. 14. Distribuzione dei microbiota tra i campioni di diversa origine botanica

Microrganismi	Origine botanica								
	Cardo	Castagno	Agrumi	Eucalipto	Nespolo	Melata	Sulla	Millefiori	Acacia
Batteri:									
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	X	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Bacillus cereus</i>	X				x	x		x	
<i>Bacillus licheniformis</i>					x			x	
<i>Bacillus megaterium</i>	X		x	x		x	x	x	
<i>Bacillus pumilus</i>	X	x		x	x	x		x	
<i>Bacillus simplex</i>		x							
<i>Bacillus subtilis</i>		x			x		x	x	
<i>Bacillus thuringiensis</i>						x		x	x
<i>Paenibacillus polymyxa</i>								x	
<i>Aerococcus viridans</i>	X								
<i>Lactococcus lactis</i>							x		
<i>Enterococcus faecalis</i>			x			x		x	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			x				x		
<i>Clostridium</i> spp.	X	x	x		x	x	x	x	x
Funghi filamentosi									
<i>Alternaria alternata</i>									x
<i>Arthrinium</i> spp.			x						x
<i>Aspergillus niger</i>			x	x		x	x	x	
<i>Aspergillus proliferans</i>			x						
<i>Aspergillus spelunceanus</i>	X								
<i>Chaetomium globosum</i>									x
<i>Cladosporium cladosporioides</i>									x
<i>Daldinia concentrica</i>									x
<i>Emericella discophora</i>							x		
<i>Emericella qinqixianii</i>							x		
<i>Emericella</i> spp.				x					
<i>Penicillium corylophilum</i>			x	x		x	x	x	x
<i>Penicillium italicum</i>			x						x
<i>Penicillium polonicum</i>			x						x
<i>Penicillium</i> spp.									x
<i>Penicillium decumbens</i>			x						x
<i>Penicillium echinulatum</i>			x						
Lieviti									
<i>Aureobasidium pullulans</i>									x
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>			x						
<i>Debaryomyces hansenii</i>	X		x		x				
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	X		x	x		x	x	x	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>					x				

I risultati ottenuti dal calcolo degli indici di diversità (Tab. 15) rivelano inoltre come la ricchezza di specie non sia uniforme tra le diverse tipologie di miele e come la biodiversità sia decisamente maggiore nel caso dei mieli millefiori.

Tab. 15. Indici di biodiversità

	Indici di biodiversità		
	H'	R	D
Millefiori	2,35	3,91	0,15
Agrumi	1,97	2,98	0,22
Sulla	1,87	2,73	0,22
Cardo	1,72	2,15	0,24
Melata	1,70	1,74	0,24
Eucalipto	1,37	1,69	0,34
Castagno	1,33	1,67	0,28
Nespolo	1,26	1,67	0,43
Acacia	1,21	1,36	0,33

CAPITOLO 4 - ANALISI DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE

RICORRENTI NEL MIELE MEDIANTE APPROCCIO NON-COLTURALE

4.1 - MATERIALI E METODI

4.1.1 - Scelta dei campioni

Uno dei maggiori problemi riscontrati con l'analisi DGGE è la comparazione dei risultati tra gel differenti in mancanza di un marker da utilizzare per la normalizzazione. Nel presente lavoro si è optato quindi per la realizzazione di un unico gel per ciascuno dei gruppi microbici oggetto di studio, scegliendo i campioni tra le tipologie di miele che avevano mostrato una maggiore biodiversità in seguito alle analisi colturali di identificazione microbica. In particolare sono stati selezionati: 3 campioni di miele di agrumi, 3 di cardo, 3 di eucalipto, 3 di sulla, 4 di millefiori e 5 di melata.

4.1.2 - Estrazione del DNA

Dopo aver testato varie metodologie di estrazione, il risultato migliore è stato ottenuto mediante il kit NucleoSpin[®] Food (Macherey-Nagel). L'estrazione è stata preceduta da una fase di preparazione dei campioni, che prevede il ricorso ad una lisi meccanica per migliorare la qualità e la quantità del templato ottenuto (Green *et al.*, 2009). Da ogni miele, accuratamente mescolato, sono stati prelevati 10 g di prodotto, trasferiti sterilmente in un flacone ed addizionati con acqua sterile fino al raggiungimento di un volume finale di 50 ml. I flaconi sono stati portati a 65 °C per 30 min. mediante bagnetto termostato, agitati manualmente ogni 5 min. e la

soluzione ottenuta centrifugata a 5000xg per 15 min. Una volta scartato il surnatante, il pellet è stato risospeso in 200 µl di acqua sterile e trasferito in una nuova eppendorf da 2 ml contenente micro biglie anch'esse sterili (circa 100 µl in volume per ogni campione). Le eppendorf sono state poi sottoposte ad agitazione orizzontalmente mediante vortex alla massima velocità per 15 min., prima di aggiungere 400 µl del buffer di lisi fornito nel kit. Il resto della procedura è stato realizzato seguendo le istruzioni riportate dalla Macherey-Nagel per l'estrazione del DNA genomico da campioni di cibo.

4.1.3 - Amplificazione PCR-DGGE

L'uso del kit e della metodologia appena descritta hanno consentito di ottenere un template con una resa contenuta (tra i 10 ed i 50 ng/µl), ma di qualità idonea per la realizzazione dei successivi passaggi. Il DNA presente nei campioni di miele è stato amplificato per i vari gruppi microbici seguendo protocolli di seguito riportati.

Eubatteri. La regione variabile V3 del gene 16S rRNA (200 bp circa) è stata amplificata utilizzando i primer universali HDA1-GC (CGCCCCG GGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGG CAGCAGT) e HDA (GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC) (Walter *et al.*, 2000). La reazione è stata realizzata seguendo il protocollo di Giannino *et al.* (2009). In un volume finale di 35 µl sono stati aggiunti Buffer 1 x; 2,5 mM di MgCl₂; 200 µM di dNTP mix; 0,5 mM di ogni primer, 1,5 U di Taq e 100 ng di template. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando i seguenti tempi e temperature di

reazione: una denaturazione iniziale a 95 °C per 10 min., 35 cicli di 94 °C per 30 sec., 57 °C per 30 sec., 72 °C per 1 min. ed un'estensione finale a 72 °C per 8 min.

Lieviti. La regione target amplificata (250 bp circa) interessa la porzione finale del gene 26S rRNA. Il protocollo utilizzato è quello proposto da Cocolin *et al.* (2000), che prevede il ricorso ai seguenti primer: NL1 (CGCCCGCCGCGCGCGCGCGGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) ed LS2 (ATTCCCAAACAACACTCGACTC). La PCR è stata realizzata in un volume totale di 50 µl contenete Buffer 1 x; 1,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di dNTP mix; 0,2 mM di ciascun primer, 1,25 U di Taq; circa 10 ng di DNA template. L'amplificazione è stata effettuata in termociclature impostando il seguente programma: una denaturazione iniziale a 95 °C per 5 min.; 30 cicli di 95 °C per 1 min., 52 °C per 45 sec., 72 °C per 1 min. ed un'estensione finale a 72 °C per 7 min.

Funghi filamentosi. L'amplificazione parziale (circa 320 bp) del gene 18S rRNA è stata ottenuta mediante il ricorso ai seguenti primer: GC-FUNG (CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCATTCCCCGTTACCCGTTG) ed NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC). Ogni reazione PCR di 25 µl contiene: Buffer 1x; 2 mmol/l MgCl₂; 1,5 U Taq DNA polimerasi; 80 µmol/l di dNTP mix, 0,5 µmol/l di ciascun primer, e circa 10 ng di DNA template (Jiajia *et al.*, 2010). Il programma impostato sul termociclature prevede una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min.; 32 cicli di 94 °C per 30 sec., 52 °C di 30 sec. e 68 °C per 5 min.; seguiti da un'estensione finale a 68 °C per 5 min. (Suzuki *et al.*, 2009).

Un volume pari a 5 µl dei diversi prodotti di PCR è stato analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio (100 ml) al 1,5% e colorato con 10 µl di Sybr Safe

DNA Gel Stain (Invitrogen), prima di essere visualizzato con gli UV e fotografato. La resa dell'amplificazione inoltre è stata misurata mediante ricorso allo spettrofotometro Nanodrop ND 1000 della Thermo Scientific. Successivamente gli ampliconi sono stati congelati a -20°C fino al momento della successiva corsa elettroforetica DGGE.

4.1.4 - Preparazione delle soluzioni necessarie per la corsa elettroforetica

Le soluzioni utilizzate nella corsa elettroforetica DGGE sono state realizzate mediante i protocolli di seguito indicati.

0,5 M EDTA 100 ml

EDTA	14,61g
H ₂ O distillata	60 ml
pH 8 con NaOH	
Portare a volume con H ₂ O distillata	

TAE 50x 1000 ml

Tris base (2ammino-2idrossimetilpropano-1,3diolo)	14,61 g
Acido acetico glaciale	57,1 ml
0,5M EDTA	100 ml
pH 7,8 con acido acetico	
Portare a volume con H ₂ O distillata	
Conservare a temperatura ambiente e diluire quando necessario.	

APS 10% 1 ml

Ammonio persolfato	0,1 g
Portare a volume con H ₂ O distillata	

LOADING DYE

Glicerolo	40 ml
H ₂ O distillata	10 ml
Blu di bromofenolo	0,25%
Xilene cianolo	0,25%
Vortexare e conservare in frigo a 4 °C	

SOLUZIONE STOCK 8% POLICRILAMMIDE 100% DENATURANTI

Soluzione 40% (acrilammide/N,N'-metilenebisacrilammide 37,5:1)	10 ml
TAE 50X	1 ml
Formamide	20 ml
Urea	21 g
Glicerolo (opzionale)	1 ml
Portare a 100 ml con H ₂ O distillata	
Conservare al buio a 4°C	

SOLUZIONE STOCK 8% POLICRILAMMIDE 0% DENATURANTI

Soluzione 40% (acrilammide/N,N'-metilenebisacrilammide 37,5:1)	10 ml
TAE 50X	1 ml
Formamide	0 ml
Urea	0 g
Glicerolo (opzionale)	1 ml
Portare a 100 ml con H ₂ O distillata	
Conservare al buio a 4°C	

4.1.5 - Corsa elettroforetica DGGE ed acquisizione dati

L'analisi DGGE è stata realizzata con l'ausilio del sistema INGENY phorU-2 su gel di poliacrilammide verticale, scegliendo la percentuale dell'8% sulla base della dimensione dei frammenti analizzati (tra 200 e 380 bp) e migliorando la flessibilità del gel mediante aggiunta del 2% di glicerolo, secondo quanto proposto da Green *et al.* (2009). I 23 ml di soluzione A (a più alto contenuto di denaturanti) e di 23 ml di soluzione B (a più basso contenuto di denaturanti), da utilizzare per la formazione del corretto gradiente, sono state preparati mescolando opportunamente quantità diverse delle due soluzioni stock. La formazione del gradiente è stata ottenuta mediante il ricorso ad agitatore HI 200 (Hanna Instruments), gradient-maker e pompa peristaltica SP 311 (VELP Scientifica). Poco prima di versare le soluzioni nel gradient-maker sono stati aggiunti 3,64 µl di APS 10% e 0,68 µl di TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiammina) per ogni ml di soluzione, al fine di consentire

la solidificazione del gel. La parte superiore del gel (stacking) è stata completata mediante l'aggiunta di 8 ml di soluzione stock priva di denaturanti, addizionata con APS e TEMED nelle stesse proporzioni viste precedentemente.

In ciascun pozzetto sono stati caricati 500 ng di amplificato PCR-DGGE, mescolati con un uguale volume di Loading Dye. La separazione degli ampliconi è stata ottenuta mediante corsa elettroforetica in una soluzione tampone TAE 1x ad 80 Volts e 40 Ampere con una temperatura costante di 60 °C per una durata di circa 17 h. Dopo la corsa, i gel sono stati prima colorati per 30 min. a 37 °C in 250 ml di TAE 1x addizionato con 25 µl di SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies); poi visualizzati mediante Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator (Invitrogen™) e quindi acquisiti mediante Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System (BioRad, Richmond, USA).

4.2 - RISULTATI

L'adeguato range di denaturanti per i diversi gruppi microbici è stato individuato mediante numerose prove di analisi DGGE, partendo da un gradiente iniziale pari a 0-80%, progressivamente ridotto alla ricerca di quei valori che consentissero un miglior compromesso tra numero e distanza reciproca delle bande. Di seguito sono riportati i range selezionati per i singoli gruppi microbici:

- Eubatteri, gradiente 30-60% di denaturanti;
- Lieviti, gradiente 35-55% di denaturanti;
- Funghi filamentosi, gradiente 25-35% di denaturanti.

Le foto 1, 2 e 3 mostrano, rispettivamente, i gel ottenuti in seguito alla corsa elettroforetica per eubatteri, lieviti e funghi filamentosi.

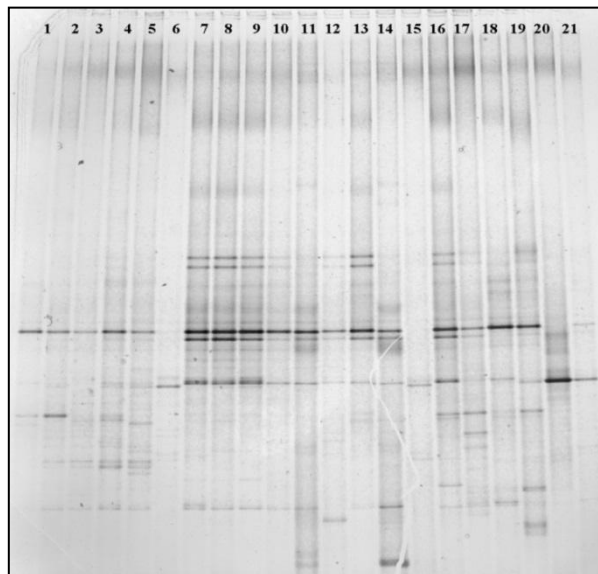


Foto 1. DGGE eubatteri, gradiente di denaturanti pari a 30-60%. Pozzetti: 1-3 agrumi, 4-6 cardo, 7-9 eucalipto, 10-14 melata, 15-18 millefiori, 19-21 sulla.

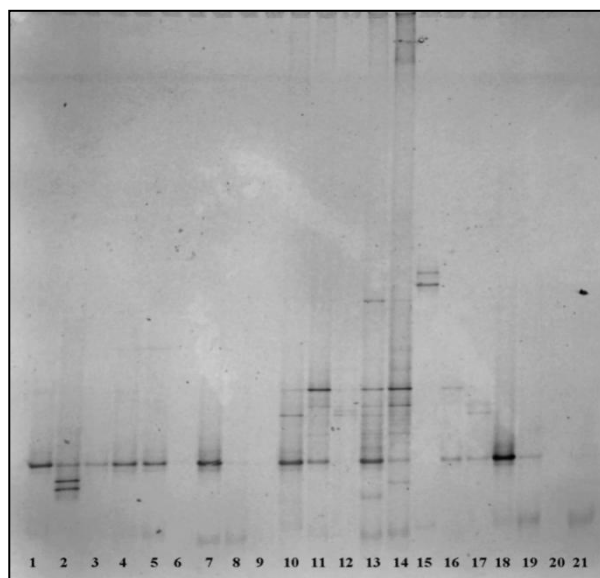


Foto 2. DGGE lieviti, gradiente di denaturanti pari a 30-60%. Pozzetti: 1-3 agrumi, 4-6 cardo, 7-9 eucalipto, 10-14 melata, 15-18 millefiori, 19-21 sulla.

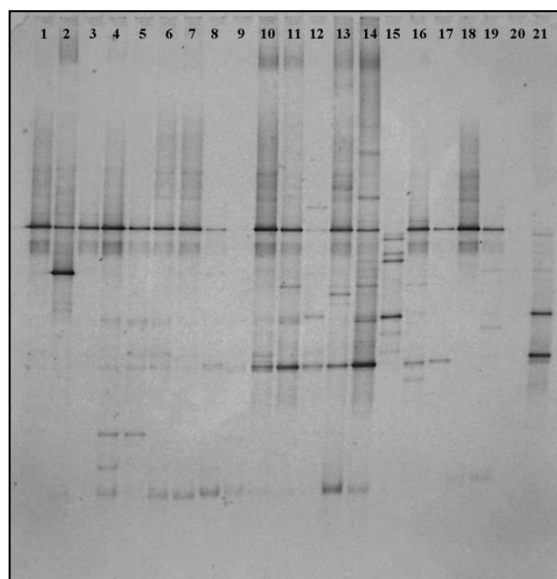


Foto 3. DGGE funghi, gradiente di denaturanti pari a 30-60%. Pozzetti: 1-3 agrumi, 4-6 cardo, 7-9 eucalipto, 10-14 melata, 15-18 millefiori, 19-21 sulla.

La successiva cluster analysis, realizzata mediante il software Gelcompare, è stata effettuata utilizzando il coefficiente di similarità proposto da Dice e l'algoritmo di clusterizzazione UPGMA con tolleranza del 1%. Al fine di evidenziare eventuali differenze ed analogie tra i vari campioni, i tre gruppi microbici (eubatteri, lieviti e funghi filamentosi) sono stati prima analizzati singolarmente e poi in modo comparato. I risultati di tali analisi sono riportati rispettivamente nelle figure 4 e 5. In esse è possibile notare come l'efficacia discriminatoria ottenuta dall'analisi dei singoli gruppi microbici sia amplificata dall'applicazione dell'analisi comparata, che (ad eccezione dei mieli di sulla) evidenzia una netta differenziazione tra le popolazioni microbiche dei vari monoflora analizzati.

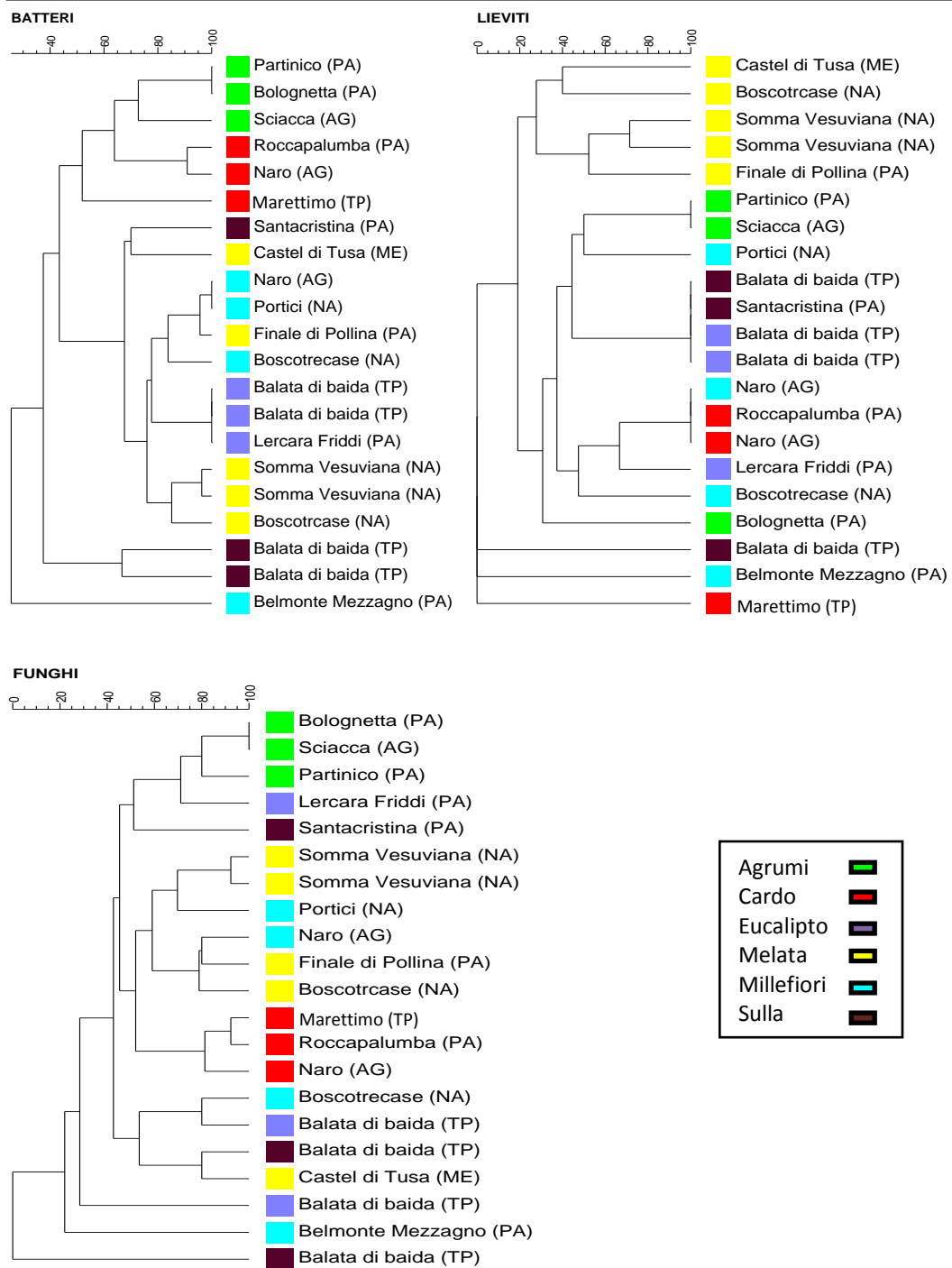


Fig. 4. Cluster analysis per singoli gruppi microbici in rapporto all'origine dei mieli analizzati.

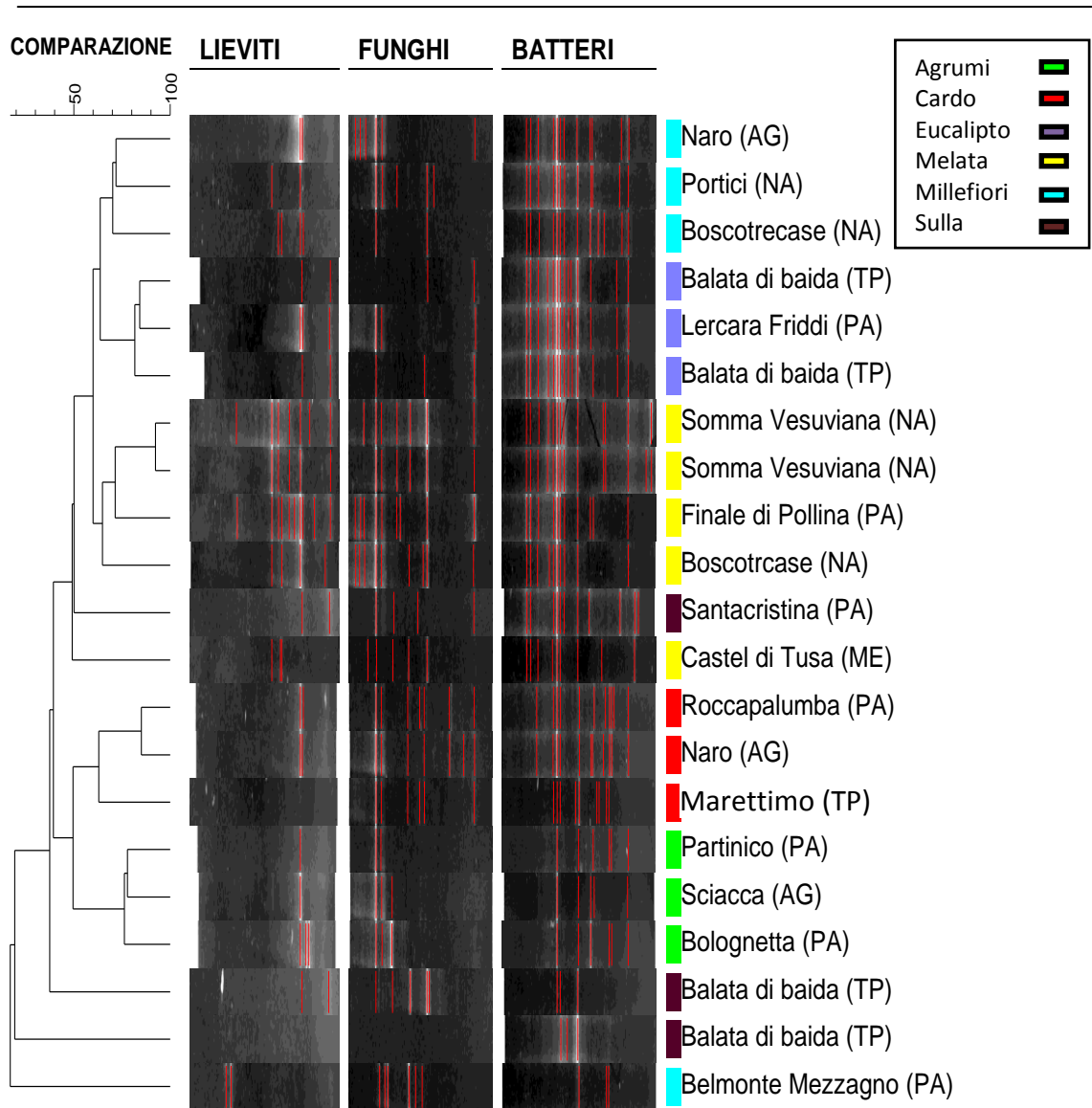


Fig. 5. Cluster analysis comparata dei tre gruppi microbici in rapporto all'origine dei mieli analizzati.

CAPITOLO 5 - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dopo l'avvento della canna da zucchero il miele ha perso gran parte della sua importanza, ma negli ultimi anni è stato rivalutato sia come alimento, che per le sue proprietà omeopatiche ed antisettiche (Arvanitoyannis e Krystallis, 2006). Le sue capacità antimicrobiche creano, infatti, delle condizioni stressanti che influiscono sulle capacità di sviluppo, accrescimento e sulla proporzione reciproca delle diverse specie microbiche. Queste qualità intrinseche possono però essere condizionate, e talvolta perfino compromesse, sia dalle norme igieniche applicate durante le fasi di estrazione e stoccaggio del prodotto, che dalle condizioni climatiche, floristico-vegetazionali e pedologiche presenti al momento della raccolta del nettare (Snowdon e Cliver, 1996).

Le nostre analisi hanno rilevato la presenza di 36 diversi microrganismi in grado di formare colonie vitali se inoculati su substrati adeguati. Tra i batteri, si registra la presenza di clostridi (isolati su RCM) nel 40% dei campioni analizzati. Tale contaminazione è già nota in letteratura (Monetto *et al.*, 1999), ma i nostri numeri sono certamente incoraggianti se paragonati agli oltre 100 UFC/g di Clostridi rilevati sui mieli argentini da Finola *et al.* (2007).

I due isolati Gram negativi, accresciuti su VRBGA, sono stati entrambi identificati come Enterobacteriaceae della specie *K. pneumoniae*. Tale batterio si trova comunemente nella flora intestinale (Ryan e Ray, 2004), ma qualora venga aspirato può raggiungere i polmoni causando infiammazioni, emorragie e necrosi. Negli ultimi anni il patogeno è divenuto molto frequente a livello nosocomiale. Ceppi di *Klebsiella* spp., resistenti ai più comuni antibiotici, sono stati individuati in diversi

ospedali nel mondo (Samra *et al.*, 2007) dove causano polmoniti ed infezioni urinarie in pazienti già immunodepressi. Il batterio è stato isolato anche nel sistema digerente di *Apis cerana* (Nada *et al.*, 2010) ed è ipotizzabile quindi che ceppi simili possano essere rinvenuti anche in *Apis mellifera*.

I cocchi Gram positivi, considerati inizialmente come presunti batteri lattici, sono stati ulteriormente suddivisi in tre sottogruppi consentendo l'identificazione di tre specie (*E. faecalis*, *L. lactis* e *A. viridans*) mai riscontrate finora su questa matrice. L'*E. faecalis* è un batterio simbiote normalmente presente nell'intestino dei mammiferi e dell'uomo (Ryan e Ray, 2004), ma alcuni ceppi, resistenti agli antibiotici, possono causare endocarditi, meningiti, ed infezioni delle vie urinarie in ambiente nosocomiale (Murray, 1990). Il batterio può trasmettersi anche attraverso alimenti ed acqua infetti ed è quindi ragionevole ipotizzare che la sua presenza possa essere dovuta all'approvvigionamento delle api da fonti idriche contaminate. Il *L. lactis* è un batterio mesofilo normalmente utilizzato nella produzione dei formaggi, ma che si ritrova anche sulle superfici vegetali (Rademaker *et al.*, 2007). Una volta ingerito dagli animali, è in grado di raggiungere il tratto gastrointestinale e di riprodursi rapidamente. Precedenti studi (Ahn *et al.*, 2012), infatti, ne hanno già evidenziato la presenza nell'apparato digerente di *A. cerana*. L'*A. viridans*, infine, è un batterio ubiquitario isolato dal suolo e dai vegetali. La sua patogenicità non è del tutto chiara: è normalmente innocuo, ma può diventare patogeno opportunisto in soggetti con scarse difese immunitarie (Martin *et al.*, 2007).

Per quel che riguarda i batteri sporigeni, precedenti studi riportano nel miele la presenza di varie specie appartenenti a *Bacillus* spp. (Iurlina e Fritz, 2005; Alippi e

Reynaldi, 2006). Nei nostri campioni l'analisi genetica ha permesso l'identificazione di nove specie, una delle quali *B. simplex* mai riscontrata su miele. Questo batterio, comunemente rinvenuto nel suolo, viene utilizzato come promotore della crescita per cereali ed ortaggi (Hassen *et al.*, 2010). Ad eccezione di due specie (*B. antracis* ed alcuni ceppi di *B. cereus* produttori di tossine) il genere è considerato sicuro per l'uomo. Finora non ci sono casi accertati di patologie dovute a *B. cereus* riconducibili al consumo di miele, anche se López e Alippi (2010) ritengono il prodotto un potenziale vettore per ceppi patogeni di *B. cereus* e *B. megaterium*. Altri studi invece (Alfonzo *et al.*, 2012; Duc *et al.*, 2004), considerando la capacità di alcuni *Bacillus* di produrre antibiotici, batteriocine e composti ad azione antifungina, ne suggeriscono l'uso sia in campo agronomico, che farmacologico. Interessante è anche il potenziale uso di questi batteri in apicoltura: alcuni ceppi di *P. polymyxa* (Lee *et al.*, 2009), *B. subtilis* (Sabatè *et al.*, 2009), *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. megaterium* (Alippi e Reynaldi, 2006), isolati da diversi apiari, sono stati testati con successo su *Paenibacillus larvae*; mentre *B. amyloliquefaciens* si è dimostrato attivo contro *Ascosphaera apis* (Brittes Benitez *et al.*, 2012), agente eziologico della covata calcificata. E' chiara quindi l'importanza di questi ceppi microbici con effetto antagonista, da applicare come mezzo di controllo biologico per quelle patologie (Yoshiyama *et al.*, 2013) che negli ultimi anni hanno pesantemente ridotto il patrimonio apistico mondiale ed influenzato l'aspetto economico del settore (Genersch, 2010). Si registra infine il mancato accrescimento di colonie su DWA-b, inizialmente allestito con lo scopo di individuare possibili batteri osmofili. Una spiegazione di questo sorprendente risultato potrebbe ricercarsi proprio nella scelta di

un substrato ancora troppo stressante per consentire la moltiplicazione delle specie batteriche presenti nel miele (Sinacori *et al.*, 2014).

Per i lieviti, le analisi molecolari hanno evidenziato la presenza di 9 ceppi suddivisi in 5 specie. Tra queste solo *Z. rouxii* e *D. hansenii* sono stati identificati tramite analisi RFLP del gene 5.8S rRNA, mentre negli altri casi gli atipici profili di restrizione hanno reso necessario il sequenziamento del dominio D1/D2 del gene 26S rRNA. Ciò non stupisce, visto che in questa regione del DNA dei lieviti altri autori hanno già constatato casi di polimorfismo atipico (Solieri *et al.*, 2007; Tofalo *et al.*, 2009). Lo *Z. mellis* è la specie più frequentemente riscontrata nei nostri campioni, in linea con quanto riportato da altri autori (Deak, 2007; Carvalho, 2006), che insieme allo *Z. rouxii* lo considerano tra i lieviti osmotolleranti più comunemente associati al miele. Quest'ultimo è un lievito in grado di sopravvivere anche in presenza di conservanti e in ambienti ad alto contenuto in zuccheri. Lo si trova come contaminante di altri alimenti come sciroppi, succhi di frutta, salse ecc. nei quali causa fenomeni fermentativi, ma è anche utilizzato a livello industriale per la produzione di aceto balsamico (Deak, 2007). Non risultano invece in letteratura precedenti segnalazioni di *A. pullulans*, *C. uzbekistanensis* e *D. hansenii* su questa particolare matrice. Il primo è un lievito cosmopolita riscontrato sulle piante, nel suolo, nelle acque e talvolta segnalato come agente fermentante di frutti trasformati o in stoccaggio (Samson *et al.*, 2004). Il secondo lo si trova prevalentemente nel suolo della regione asiatica. Esso è presente anche in altri cibi (formaggi, carne ecc.) con scarsa disponibilità di acqua libera e recentemente è stato rinvenuto come specie opportunistica anche in pazienti debilitati da linfoma (Powel *et al.*, 2012). Il terzo è un

lievito osmotollerante presente in molti habitat (formaggi, carni, suolo e prodotti zuccherini). In campo agroalimentare questo lievito presenta un buon potenziale biotecnologico (Breuer e Harms, 2006): può svilupparsi in substrati contenenti fino al 25% di NaCl ed è in grado di modificare il microbiota dei formaggi inibendo per competizione lo sviluppo dei clostridi. (Faticenti *et al.*,1983).

Per quel che riguarda i funghi filamentosi, le analisi fenotipiche e genotipiche hanno consentito di suddividere gli isolati in 17 gruppi comprendenti 8 generi: *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Daldinia*, *Penicillium* e *Emericella*. Le specie da noi più frequentemente isolate sono: *P. corylophilum* e *A. niger*, riscontrate rispettivamente nel 50% e nel 32% dei campioni analizzati. Il risultato è in linea con quanto riportato da altri autori (Nasser, 2004; Kačániová *et al.*, 2009) che considerano i funghi appartenenti ai generi *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Aspergillus* comuni contaminanti del miele. Questi generi comprendono diverse specie ubiquitarie e sono considerati tra i principali allergeni fungini, talvolta patogeni per soggetti con scarse difese immunitarie (Horner *et al.*, 1995; Vijay e Kurup, 2004). Le loro spore, prodotte in notevole quantità, possono essere inalate facilmente dall'uomo, ma in condizioni normali, vengono comunque tollerate da un organismo in buona salute. Nel genere *Penicillium* ed *Aspergillus* sono comprese sia specie attive produttrici micotossine ad effetto mutageno, che specie utili in ambito alimentare e farmaceutico (Skaug, 2003). L'*A. niger*, nonostante la presenza di alcuni ceppi in grado di produrre ocratossine e citotossine potenzialmente dannose per l'uomo, viene considerato relativamente sicuro ed è largamente utilizzato per la produzione industriale di acido citrico (Schuster *et al.*, 2002; Speth, 2000). Studi

effettuati su *P. corylophilum* ne dimostrano invece il potenziale entomopatogeno su diversi insetti vettori di malattie tropicali (Da Costa *et al.*, 1998). *D. concentrica* e *C. globosum* sono funghi saprofiti opportunisti che vivono prevalentemente su legno in decomposizione. Di quest'ultimo è nota anche la capacità di produrre metaboliti secondari e recenti studi lo propongono come possibile antagonista di diversi patogeni del suolo (Park *et al.*, 2005; Shanthiyaa *et al.*, 2013). Le tossine di *A. alternata*, infine, sono ritenute possibili concause di problemi respiratori, nonostante la presenza limitata nei cibi ed i pochi casi riportati in letteratura (Lawley, 2009).

Delle diverse specie microbiche isolate, solo alcune hanno mostrato una notevole capacità di adattamento a questa particolare matrice, colonizzando il prodotto indipendentemente dalla sua origine botanica, ma il calcolo degli indici di biodiversità ha rilevato come l'essenza nettarifera possa influenzare la complessità microbica del prodotto finale. Il valore più alto è stato riscontrato, infatti, nel miele millefiori verosimilmente a causa dell'eterogeneità della fonte di approvvigionamento iniziale.

In generale, i valori ottenuti dalle conte appaiono minori o uguali a quelli registrati nelle produzioni industriali (Snowdon e Cliver, 1996). L'unica eccezione, riguardante l'elevata presenza di lieviti isolati dal campione Miel 1 (nespolo), è probabilmente imputabile al periodo di produzione. La naturale igroscopicità del miele (Zumla e Lulat, 1989) e le condizioni sfavorevoli di umidità (produzione invernale) durante le fasi di raccolta e stoccaggio, possono infatti incrementare la quantità di acqua disponibile e favorire la moltiplicazione delle cellule blastomicetiche. Alla luce di tutto ciò possiamo quindi confermare la professionalità

degli apicoltori locali, capaci di realizzare un prodotto dagli elevati standard qualitativi ed igienico-sanitari.

Ulteriori indagini sarebbero necessarie per chiarire l'azione patogena di alcuni microrganismi riscontrati, ma i bassi livelli rilevati confermano le potenzialità antisettiche del miele ed un buon livello di sicurezza alimentare per il consumo del prodotto fresco.

Per quel che riguarda le analisi non colturali, va rilevato come l'estrazione del DNA totale da miele sia risultata piuttosto complessa. Il template ottenuto dalle prove preliminari, una volta amplificato mediante PCR, ha spesso restituito un prodotto inadeguato alla successiva corsa elettroforetica sia in termini quantitativi (presenza di bande flebili, sintomo di una scarsa concentrazione degli ampliconi) che qualitativi (presenza di numerose bande aspecifiche). Si ritiene che tale difficoltà di estrazione sia principalmente imputabile all'elevato contenuto in zuccheri della matrice iniziale. Questi, infatti, interferiscono con l'attività della polimerasi (Sangwan *et al.*, 1998; Tel-Zur *et al.*, 1999) e possono essere causa di anomalie nelle cinetiche di riassociazione (Murray e Thompson, 1980). Inoltre, gli zuccheri tendono a co-precipitare insieme al DNA rendendolo più viscoso e determinando una maggiore adesione ai pozzetti durante l'elettroforesi (Puchooa, 2004; Chakraborty *et al.*, 2006). La corsa elettroforetica ha dimostrato comunque che l'essenza botanica è in grado di influenzare non solo le caratteristiche fisiche, chimiche ed organolettiche, ma anche quelle microbiologiche. In particolare la cluster analysis, effettuata per singolo gruppo microbico, ha consentito una differenziazione di alcune tipologie di prodotto, evidenziando una diversa composizione microbica in termini quali-quantitativi. Si

noti ad esempio come i mieli di melata possano essere ben discriminati sulla base di una più complessa popolazione blastomicetica, piuttosto che su una mera somiglianza dei profili elettroforetici. Ancora più interessante appare poi l'efficacia discriminatoria per i mieli uniflorali (ad eccezione del miele di sulla) ottenuta mediante lo studio comparato dei tre gruppi microbici. Sebbene siano necessari successivi studi in merito e la creazione di un ampio database di confronto, il risultato ottenuto è decisamente incoraggiante e consente di proporre l'utilizzo della DGGE come metodologia idonea sia alla valutazione igienico-sanitaria che alla verifica d'origine del prodotto, presupposti fondamentali per ogni politica di valorizzazione della produzione locale.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Adiguzel A., (2006). PhD Thesis: *Molecular characterization of thermophilic bacteria isolated from water samples taken from various thermal plants*. Atatürk University, Graduate School at Natural and Applied Sciences, Erzurum, Turkey.
- Adiguzel A., Ozkan H., Baris O., Inan K., Gulluce M., Sahin F., (2009). *Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey*. Journal of Microbiological Methods. 79: 321-328.
- Ahn J.H., Hong I.P., Bok J.I., Kim B.Y., Song J., Weon H.Y., (2012). *Pyrosequencing analysis of the bacteria communities in the cuts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea*. The Journal of Microbiology. 50 (5): 735-45.
- Alfonso C., Raposo R., Melgarejo P., (2000). *Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain*. Plant Pathology. 49 (2): 243-251.
- Alfonzo A., Lo Piccolo S., Conigliaro G., Ventorino V., Burruano S., Moschetti G., (2012). *Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens*. Annals of Microbiology. 62: 1593-1599.
- Alippi M.A., Lopez C.A., Aguilar M.O., (2002). *Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honey bees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology. 68: 3655- 3660.
- Alippi A.M., Reynaldi F.J., (2006) *Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources*. Journal of Invertebrate Pathology. 91 (3): 141-146.
- Allen K.L, Molan P.C., Reid G.M., (1991). *A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys*. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics. 43: 817-822.
- Al-Mamary M., Al-Meerri A., Al-Habori M., (2002). *Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey*. Nutrition Research. 22: 1041-1047.
- Alvarez-Saurez J.M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli F., Battino M., (2010). *Contribution of honey in nutrition and human health: a review*. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism. 3: 15-23.
- Ampe F., Ben Omar N., Moizan C., Wachter C., Guyot J. P., (1999). *Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in the Mexican pozon, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent method to investigate traditional fermentations*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 5464-5473.

- Anklam E., (1998). *A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey*. Food Chemistry. 63 (4): 549-562.
- Arculeo P., Sabatini A.G., (2007). *Il miele di timo: una tipica produzione italiana da salvaguardare*. Apoidea. 4 (1): 30-34.
- Arvanitoyannis I., Krystallis A., (2006). *An empirical examination of the determinants of honey consumption in Romania*. International Journal of Food Science & Technology 41: 1164-1176.
- Bansal V., Medhi B., Pandhi P., (2005). *Honey a remedy rediscovered and its therapeutic utility*. Kathmandu University Medical Journal. 3: 305-309.
- Bardy J., Slevin N.J., Mais K.L., Molassiotis A., (2008). *A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care*. Journal of Clinical Nursing. 17: 2604-2623.
- Barnett H.L., Hunter B.B., (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th ed. Burgess publishing.
- Beretta G., Orioli M., Maffei R., (2007). *Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures*. Planta medica. 73 (11): 1182-1189.
- Beuchat L., Frandberg E., Deak T., Alzamora S., Chen J., Guerrero S., Lopez-Malo A., Ohlsson I., (2001). *Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study*. International Journal of Food Microbiology. 70: 89-96.
- Bogdanov S, Kilchenmann V, Fluri P.,(1998). *Influence of organic acids and components of essential oils on honey tastes*. American Bee Journal. 139: 61-63.
- Bogdanov S., Imdorf A., Charrière J.D., Fluri P., Kilchenmann V., (2003). *Qualità dei prodotti apistici e fonti d'inquinamento*. Centro svizzero di ricerche apicole.
- Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P., (2008). *honey for nutrition and health: a review*. Journal of the American College of Nutrition. 27 (6): 677-689.
- Breuer U., Harms H., (2006). *Debaryomyces hansenii an extremophilic yeast with biotechnological potential*. Yeast. 23(6): 415-37.
- Brittes Benitez L., Voltolini Velho R., De Souza Da Motta A., Segalin J., Brandelli A., (2012). *Antimicrobial factor from Bacillus amyloliquefaciens inhibits Paenibacillus larvae, the causative agent of American foulbrood*. Archives of Microbiology. 194: 177-185.
- Butta A., Caserio G., Bizzozera M., Colombo M., (1983). *Indagine sulla qualità merceologica e sulle caratteristiche microbiologiche di mieli in commercio*. Industrie alimentari. 210: 838-844.
- Carvalho M.C., Rocha A., Estevinho L., Choupina A.B., (2006). *Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region*. Ciencia y Tecnologia Alimentaria. 5 (1): 11-17.

- Ceauși C., Țogoe I., Tudor L., Furnaris F., (2009). *The evaluation of microbiological quality of some bee honey sorts*. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine. 66 (1): 273-277.
- Chakraborty D., Sarkar A., Gupta S., Das S., (2006). *Small and large scale genomic DNA isolation protocol for chickpea (Cicer arietinum L.), suitable for molecular marker and transgenic analysis*. African Journal of Biotechnology. 5: 585-589.
- Christy E., Manyi-Loh A., Clarke M., Roland N., (2010). *An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health*. African Journal of Microbiology Research. 5 (8): 844-852.
- Cocolin L., Bisson L.F., Mills D.A., (2000). *Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations*. FEMS Microbiology Letters. 189: 81-87.
- Codex Alimentarius, Rev. 2 (2001). *Revised Codex Standard for Honey*, Codex STAN 12-1981.
- Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G., (2002). *The sensitivity to honey of Gram positive cocci of clinical significance isolated from wounds*. Journal of Applied Microbiology. 93: 857-863.
- Da Costa G.L., De Moraes A.M.L, De Oliveira P.C., (1998). *Pathogenic action of Penicillium species on mosquito vectors of human tropical diseases*. Journal of Basic Microbiology. 38, 337 -341.
- Deak T., (2007). *Yeasts in specific types of foods*. In Handbook of Food Spoilage Yeasts, 2nd ed., pp. 117-201. Edited by T. Deak. Boca Raton: CRC Press.
- Dias L.A., Peres A.M., Vilas-Boas M., Rocha M.A., Estevinho L., Machado A.A., (2008). *An electronic tongue for honey classification*. Microchimica Acta. 163: 97-102.
- Dice L.R., (1945). *Measures of the amount of ecologic association between species*. Ecology. 26: 297-302.
- Dieuleveux V., Lemarinier S., Gueguen M., (1998a). *Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid*. International Journal of Food Microbiology. 40: 177-183.
- Dieuleveux V., Van Der Pyl D., Chataud J., Gueguen M., (1998b). *Purification and characterization of anti-Listeria compounds produced by geotrichum candidum*. Applied and Environmental Microbiology. 64: 800-803.
- Dimou M., Katsaros J., Tzavella Klonari K., Thrasyvoulou A., (2006). *Discriminating pine and fir honeydew honeys by microscopic characteristics*. Journal of Apicultural Research. 45 (2): 16-21
- Domsh K.H., Gams W., Anderson T.H., (2007). *Compendium of Soil Fungi*. 2nd Ed. APS press.
- Duc L.H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M., (2004) *Characterization of Bacillus probiotics available for human uses*. Applied and Environmental Microbiology. 70: 2161-2171.
- Ercolini D., Moschetti G., Blaiotta G., Coppola S., (2001). *Behaviour of variable V3 R*

- *region from 16S rDNA of Lactic Acid Bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis*. Current Microbiology. 42: 199-202.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A., (1999) *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 329-337.
- Estevinho L., Pereira A.P., Moreira L., Dias L.G., Pereira E., (2008). *Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey*. Food Chemistry. 46: 3774-3779.
- Fanelli M.R., Tamburri M., (2004). *I risultati di un'indagine conoscitiva sul comparto apistico molisano*. Apitalia. 2: 11-22.
- Fatichenti F., Bergere J.L., Deiana P., Farris G.A., (1983). *Antagonistic activity of Debaryomyces hansenii towards Clostridium tyrobutyricum and C. butyricum*. Journal of Dairy Research. 50: 439-445.
- FDA BAM., (2006). *Most probable number determination from serial dilutions*. Bacteriological Analytical Manual Online, Appendix 2.
- Finola M.S., Lasagno M.C., Marioli J.M., (2007). *Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina*. Food Chemistry. 100 (4): 1649-1653.
- Fisher S.G., Lerman L.S., (1980). *Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 77: 4420-4424.
- Gardes M., Bruns T.D., (1993). *ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts*. Molecular Ecology. 2: 113-118.
- Genersch E., (2010). *Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping*. Applied Microbiology and Biotechnology. 87 (1): 87-97.
- Ghidini S., Mercanti C., Dalcanale E., Pinalli R., Bracchi P.G., (2008). *Italian honey authentication*. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma. 28: 113-121.
- Giannino M.L., Marzotto M., Dellaglio F., Feligini M., (2009). *Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods*. International Journal of Food Microbiology. 130: 188-195.
- Gordon R.E., Haynes C.H., Pang N., (1973). *The genus Bacillus*. Handbook No. 427. U.S. Department of Agriculture. Washington, D.C.
- Green S.J., Leigh M.B., Neufeld J.D., (2009). *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis*. Ed. Timmis K.N. Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds. 4137-4158.
- Gregersen T., (1978). *Rapid method for distinction of Gram negative from Gram-positive bacteria*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 5: 123-127.
- Hassen A.I., Labuschagne N., (2010). *Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the*

- rhizoplane of grasses*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26: 1837-1846.
- Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W., (1997). *Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism*. Microbial Ecology. 35: 1-21.
 - Horner W.E., Helbling A., Salvaggio J.E., Lehrer S.B., (1995). *Fungal allergens*. Clinical Microbiology Reviews. 8: 161-179.
 - Iurlina M.O., Fritz R., (2005). *Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources*. International Journal of Food Microbiology. 105: 297-304.
 - ISO 21527-2:2008. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95*.
 - Jensen G.B., Larsen P., Jacobsen B.L., Madsen B.A., Smidt L., Andrup L., (2002). *Bacillus thuringiensis in faecal samples from greenhouse workers after exposure to B. thuringiensis-based pesticides*. Applied Environmental microbiology. 68: 4900-4905.
 - Jeyaram K., Romi W., Singh T.A., Adewumi G.A., Basanti K., Oguntoyinbo F.A., (2011). *Distinct differentiation of closely related species of Bacillus subtilis group with industrial importance*. Journal of Microbiological methods. 87 (2): 161-164.
 - Jiajia N., Yuhe Y., Weisong F., Qingyun Y., Gang P., Bo Y., Xiang Z., Xuemei L., (2010) *Impacts of algal blooms removal by chitosan-modified soils on zoo plankton community in Taihu Lake, China*. Journal of Environmental Sciences. 22 (10): 1500-1507.
 - Juste´ M.S., Krause B., Lievens M., Klingeberg C.W., (2008). *Protective effect of hop b-acids on microbial degradation of thick juice during storage*. Journal of Applied Microbiology. 104: 51-59.
 - Kačániová M., Pavlicova S., Hascik P., Kociubinski G., Knazovicka V., Sudzina M., Sudzinova J., Fikselova M., (2009). *Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia.*, Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 56 (3): 285-295.
 - Kurtzman C.P., Fell J.W., (1998). *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Amsterdam Elsevier.
 - Kurtzman C.P., Robnett C.J., (2003) *Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses*. Fems Yeast Research. 3 (4): 417-432.
 - Lauro F.M., Favaretto M., Covolo L., Rassu M., Bertoloni G., (2003). *Rapid detection of Paenibacillus larvae from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol*. International Journal of Food Microbiology. 81: 195-201.
 - Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A., (2003). *Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products*. Applied and Environmental Microbiology. 69 (1): 634-640.
 - Lawley, R. (2009). *Alternaria toxins*. <http://www.mycotoxins.org>.

- Lay-Flurrie K., (2008). *Honey in wound care: effects, clinical application and patient benefit*. British Journal of Nursing. 17: 32-36.
- Lee H., Churey J.J., Worobo R.W., (2009). *Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by Bacillus thuringiensis SF361*. FEMS Microbiology Letters. 299 (2): 205-213.
- Lopez A.C.; Alippi A.M., (2010). *Enterotoxigenic gene profiles of Bacillus cereus and Bacillus megaterium isolates recovered from honey*. Revista Argentina De Microbiologia. 42 (3): 216-225.
- Lupski J.R., Weinstock G.M., (1992) *Short, interstersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes*. Journal of Bacteriology. 174: 4525-4529.
- Malika N., Mohammed F., Chakib E.A., (2004). *Antimicrobial activity of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibiotic resistant strains of bacteria*. International Journal of Agriculture and Biology. 6 (2): 289-293.
- Marchenay P., (1986). *L'uomo e l'ape*. Edagricole
- Martín V., Vela A.I., Gilbert M., Cebolla J., Goyache J., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F., (2007). *Characterization of Aerococcus viridans isolates from swine clinical specimens*. Journal of Clinical Microbiology. 45 (9): 3053-3057.
- Molan P.C., (2001a) *Potential of honey in the treatment of wounds and burns*. American Journal of Clinical Dermatology. 2: 13-19.
- Molan P.C., (2001b). *The potential of honey to promote oral wellness*. General Dentistry. 49: 584-589.
- Molan P.C., (2002). *Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers-theory and practice*. Ostomy Wound Manage. 48: 28-40.
- Monetto A.M., Francavilla A., Rondini A., Manca L., Siravegna M., Fernandez R., (1999). *A study of botulinum spores in honey*. Anaerobe. 5: 185-186.
- Moreschi I., (2007). *Osservazioni sull'attività di Apis mellifera nella raccolta del polline in un contesto floristico noto in Alta Val Canonica*. Apoidea. 4 (1): 20-29.
- Moschetti G., Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F., Deiana P., Coppola S., (1998). *Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate Streptococcus thermophilus strain*. Journal Applied Microbiology. 85: 25-36.
- Mu W., Yu S., Zhu L., Zhang T., Jiang B., (2012). *Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound*. Applied Microbiology and Biotechnology. 95 (5): 1155-63.
- Murray M.G., Thompson W.F., (1980). *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. Nucleic Acids Research. 8: 4321-4325.
- Murray B.E., (1990). *The life and times of the Enterococcus*. Clinical Microbiology Reviews. 3 (1): 46-65.
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G., (1993). *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of*

- polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16SrRNA*. Applied and Environmental Microbiology. 59: 695-700.
- Nada D.V., Vukovic V., Nedic N., (2010). *Pathogenicity of some bacterial species isolated from the bee digestive tract*. Acta Veterinaria-beograd. 60 (1): 49-57.
 - Nakano H., Sakaguchi G., (1991). *An unusually heavy contamination of honey products by Clostridium botulinum type F and Bacillus alvei*. FEMS Microbiology Letters. 79: 171-178.
 - Naldi G., Benvenuti M., Masci A., Frascetti L., Gubiani. M., (2009). *Schema di riferimento per la programmazione delle iniziative nel settore apistico*. <http://www.reterurale.it/api/L/IT>.
 - Nasser L.A., (2004). *Isolation and characterization of fungi contaminating packaged honey commonly consumed in Saudi Arabia*. Assiut University Bulletin for Environmental Research. 7 (1): 1-7.
 - Oddo L., Piana L., Sabatini A.G., (1997) (a cura di). *Conoscere il miele: guida all'analisi sensoriale*. Istituto Nazionale di apicoltura, Bologna.
 - Oddo L., Piana M.L., D'Albore G.R., (2007) (a cura di). *I mieli regionali italiani: Caratterizzazione melissopalinoologica*, Ministero delle Politiche Agricole e Forestali; C.R.A Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma.
 - O'Donnell K., Cigelnik E., Nirenberg H.I., (1998). *Molecular systematics and phylogeography of the Gibberella fujikuroi species complex*. Mycologia. 90: 465-493.
 - Ohhira I., Kuwaki S., Morita H., Suzuki T., Tomita S., Hisamatsu S., Sonoki S., Shinoda S., (2004). *Identification of 3-phenyllactic (Galactites tomentosa Moench) honey*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59: 364-369.
 - Paffetti D., Barberio C., Casalone E., (1995). *DNA-fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and DNA restriction-fragment-length-polymorphism is useful for yeast typing*. Research in Microbiology. 146 (7): 587-591.
 - Parente E., Cogan T.M., (2004). *Starter cultures: general aspects*. Chap. 6 In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, Elsevier, London. 123-148.
 - Park J.H., Choi G.J., Jang S.K., Lim K.H., Kim T.H., Cho Y.K., Kim J.C., (2005). *Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from Chaetomium globosum*. FEMS Microbiology Letters. 252: 309-313
 - Piana M.L., Poda G., Cesaroni D., Cuetti L., Bucci M.A., Gotti P., (1991). *Research on microbial characteristics of honey samples of Udine province*. Rivista della Società Italiana di Scienze dell'Alimentazione. 20: 293- 301.
 - Popa M., Vica M., Axinte R., Glevitzky M., Varvara S., (2009). *Correlations on the microbiological and physicochemical characteristics of different types of honey*. Journal of environmental protection and ecology 10 (4): 1113-1121.
 - Powel M.S., Alizadeh A.A., Budvytiene I., Schaenman J.M., Banaei N., (2012). *First isolation of Cryptococcus uzbekistanensis from an*

- immunocompromised patient with lymphoma*. Journal of Clinical Microbiology. 50 (3): 1125-1127.
- Prakitchaiwattana C.J., Fleet G.H., Heard G.M., (2004). *Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeasts ecology of wine grapes*. FEMS Yeasts Research. 4: 865-877.
 - Puchooa D., (2004). *A simple rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (Litchi chinensis Sonn.)*. African Journal of Biotechnology. 3: 253-255.
 - Qiu P.Y., Ding H.B., Tang Y.K., Xu R.J., (1999). *Determination of chemical composition of commercial honey by near infrared spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47: 2760-2765.
 - Rademaker J. L.W., Herbet H., Starrenburg M.J.C., Naser S.M., Gevers D., Kelly W.J., Hugenholtz, J., (2007). *Diversity analysis of dairy and nondairy Lactococcus lactis isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting*. Applied and environmental microbiology. 73 (22): 7128-37.
 - Rappe M.S., Giovannini S.J., (2003). *The uncultured microbial majority*. Annual Review of Microbiology. 57: 369-394.
 - Rosselló-Mora R., Amann R., (2001). *The species concept for prokaryotes*. FEMS Microbiology Reviews. 25: 39-67.
 - Ruiz-Argueso T., Rodriguez-Navarro A., (1975). *Microbiology of Ripening Honey*. Applied Microbiology. Dec. 893-896.
 - Ryan K.J., Ray C.G., (2004). *Sherris Medical Microbiology* 4th ed. McGraw Hill Professional eds.
 - Sabatè D.C., Carrillo L., Audisio M.C., (2009). *Inhibition of Paenibacillus larvae and Ascospaera apis by Bacillus subtilis isolated from honeybee gut and honey samples*. Research in Microbiology. 160: 163-169.
 - Samra Z., Ofir O., Lishtzinsky Y., Madar-Shapiro L., Bishara J. (2007). *Outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel*. International Journal of Antimicrobial Agents. 30: 525-529.
 - Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. 7th. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
 - Sangwan N.S., Sangwan R.S., Kumar S., (1998). *Isolation of genomic DNA from the antimalarial plant Artemisia annua*. Plant Molecular Biology Reporter. 16: 1-8.
 - Saraiva M., Campos Cunha I., Costa Bonito C., Pena C., Toscano M., Teixeira Lopes T., Sousa I., Calhau A., (2012). *First case of infant botulism in Portugal*. Food Control. 26: 79-80.
 - Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck P.W., (2002). *On the safety of Aspergillus niger: a review*. Applied microbiology and biotechnology. 59: 426-35.
 - Schwenninger S.M., Lacroix C., Truttmann S., Jans C., Spordli C., Bigler L., Meile L. (2008). *Characterization of low-molecular-weight antiyeast*

- metabolites produced by a food-protective Lactobacillus-Propionibacterium coculture.* Journal of Food Protection. 71: 2481-2487.
- Scialpi A., Mengoni A., (2008) *La PCR e le sue varianti.* Quaderno di laboratorio. Firenze university Press
 - Seijo M.C., Escuredo O., Fernandez-Gonzalez M., (2011). *Fungal diversity in honeys from northwest Spain and their relationship to the ecological origin of the product source.* GRANA. 50 (1): 55-62.
 - Senses-Ergul S; Ozbas Z.Y., (2006). *Characterization of the yeast flora present in some Turkish high-sugar products.* Journal of General and Applied Microbiology. 52 (2): 99-106.
 - Settanni L., Van Sinderen D., Rossi J., Corsetti A., (2005). *Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough Lactobacillus species by multiplex PCR.* Applied and Environmental Microbiology. 71: 3049-3059.
 - Settanni L., Corsetti A., (2007). *The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: a review.* Journal of Microbiological Methods. 69: 1-22.
 - Shanthiyaa V., Saravanakumar D., Rajendran L., Karthikeyan G., Prabakar K., Raguchander T., (2013). *Use of Chaetomium globosum for biocontrol of potato late blight disease.* Crop Protection. 52: 33-38.
 - Sinacori M., Francesca N., Alfonzo A., Cruciata M., Sannino C., Settanni L., Moschetti G., (2014). *Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin.* Food Microbiology. (38): 284-294.
 - Skaug M.A., (2003). *Levels of ochratoxin A and IgG against conidia of Penicillium verrucosum in blood samples from healthy farm workers.* Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 10 (1): 73-77.
 - Snow M.J., Harris M.M., (2004). *On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey.* Food Chemistry. 84: 145-147.
 - Snowdon J.A.; Cliver D.O., (1996). *Microorganisms in honey.* International Journal of Food Microbiology. 31 (3): 1-26.
 - Solieri L., Cassanelli S., Giudici P., (2007). *A new putative Zygosaccharomyces yeast species isolated from traditional balsamic vinegar.* Yeast. 24 (5): 403-417.
 - Somal N.A., Coley K.E., Molan P.C., Hancock B.M., (1994). *Susceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey.* Journal of the Royal Society of Medicine. 87 (1): 9-12.
 - Speth C., Rambach G., Lass-Florl C., Wurzner R., Gasque P., Mohsenipour I., Dierich M.P., (2000). *Culture supernatants of patient-derived Aspergillus isolates have toxic and lytic activity towards neurons and glial cells.* FEMS Immunology and Medical Microbiology. 29 (4): 303-313.
 - Stenlid J., Karlsson J., Hogberg N., (1994). *Intraspecific genetic-variation in Heterobasidion annosum revealed by amplification of minisatellite dna.* Mycological Research. 98 (1): 57-63.
 - Suzuki C., Nagaoka K., Shimada A., Takenaka M., (2009). *Bacterial communities are more dependent on soil type than fertilizer type, but the*

- reverse is true for fungal communities*. Soil Science and Plant Nutrition. 55: 80-90.
- Tallent S.M., Rhodehamel E.J., Harmon S.M., Bennett R.W., (2012). *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 14. FDA BAM.
 - Tel-Zur N., Abbo S., Myslabodski D., Mizrahi Y., (1999). *Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera Hylocereus and Selenicereus (Cactaceae)*. Plant Molecular Biology Reporter 17: 171-178.
 - Tofalo R., Chaves-Lopez C., Di Fabio F., Schirone M., Felis G.E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G., (2009). *Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must*. International Journal of Food Microbiology. 130 (3): 179-187.
 - Tysset C., Rousseau M., (1981). *Problem of microbes and hygiene of commercial honey*. Revue de Médecine Vétérinaire 132: 591-600.
 - Ventorino V., Chiurazzi M., Aponte M., Pepe O., Moschetti G., (2007). *Genetic diversity of a natural population of Rhizobium leguminosarum by. viciae nodulating plants of Vicia faba in the vesuvian area*. Current Microbiology. 55: 512-517.
 - Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R., (1994). *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*. Methods in Molecular and Cellular Biology. 5: 25-40.
 - Vijay H.M., Kurup V.P., (2004). *Fungal allergens*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 18: 223-49.
 - Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A., (2008). *Functional properties of honey, propolis, and royal jelly*. Journal of Food Science. 73: 117-124.
 - Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T., (2000). *Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 297-303.
 - Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., (1991). *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. Journal of Bacteriology. 173: 697-703.
 - Weston R.J., (2000). *The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review*. Food Chemistry. 71: 235-239.
 - White J.W., Subers M.H., Schepartz A.I., (1963). *The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system*. Biochimica et Biophysica Acta. 73: 57-70.
 - White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White, TJ (Eds), *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Academic Press, San Diego. 315-322.

- White J.W., (2000). *Isotope ratio testing of honey: demystifying the internal standard test*. American Bee Journal. 140: 318-321.
- Williams G., Kubelik A., Livak K., Rafalski A., Tingey S., (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acid Research. 18: 6531-6535.
- Yoshiyama M., Wu M., Sugimura Y., Takaya N., Kimoto-Nira H., Suzuki C., (2013). *Inhibition of Paenibacillus larvae by lactic acid bacteria isolated from fermented materials*. Journal of Invertebrate Pathology. 112 (1): 62-67.
- Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F., (1998). *Differentiation of Lactobacillus sanfranciscensis strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis*. FEMS Microbiology Letters. 166: 324-332.
- Zhou Q., Wintersteen C.L., Cadwallader R.W., (2002). *Identification and quantification of aroma-active components that contribute to the distinct malty flavor of buckwheat honey*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 2016-2021.
- Zumla A., Lulat A., (1989). *Honey: a remedy rediscovered*. Journal of the Royal Society of Medicine. 82 (7): 384-385.

RIFERIMENTI NORMATIVI

- Decreto Legislativo del 6 aprile 2006, n.193 *Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari*. Gazzetta Ufficiale n. 121 del 26 maggio 2006. Supplemento Ordinario n. 127.
- Decreto Legislativo del 21 maggio 2004, n.179 *Attuazione della direttiva 2001/110/CE concernente la produzione e la commercializzazione del miele*. Gazzetta Ufficiale n. 168 del 20 luglio 2004.
- Decreto Ministeriale del 4 dicembre 2009. *Disposizioni per l'anagrafe apistica nazionale*. Gazzetta Ufficiale n. 93 del 22 aprile 2010.
- Direttiva 2001/110/CE del 20 dicembre 2001. *Direttiva del Consiglio concernente il miele*. Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea del 12 gennaio 2002
- Legge 313 del 24 ottobre 2004. *Disciplina dell'apicoltura*. Gazzetta Ufficiale n. 306 del 31 dicembre 2004.

RINGRAZIAMENTI

Se sono riuscito a portare a termine questa mia esperienza di studio e di vita lo devo anche a coloro che mi hanno accompagnato in questo percorso. Vorrei prima di tutto ringraziare i miei genitori e Rosaria che, in modo diverso, hanno saputo aiutarmi e sostenermi nei momenti difficili.

Un sentito grazie va anche tutta la Sezione di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria del Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali dell'Università degli Studi di Palermo. Grazie ad Alessandra Martorana, Antonio Alfonso, Ciro Sannino, Giusi Ventimiglia, Margherita Cruciata, Raimondo Gaglio, Rosa Guarcello, Silvana Intile e Walter Randazzo, splendidi compagni di avventura. Un grazie particolare al Dott. Luca Settanni, valida guida nella realizzazione dei lavori, e a Nicola Francesca per i suoi preziosi consigli e per il sostegno tecnico e morale.

Mi è stato detto che non è elegante ringraziare il tutor per il lavoro svolto, ma io voglio comunque rivolgere un ringraziamento speciale al Prof. Giancarlo Moschetti che, nonostante tutto, mi ha dato la possibilità di intraprendere questo percorso.

Tutti insieme abbiamo affrontato il lavoro, i successi e le difficoltà legate alla ricerca, talvolta abbiamo gioito e qualche volta ci siamo anche scontrati, ma spero di essere riuscito a restituire a tutti almeno un po' di quanto voi avete regalato a me.

Grazie mille.