

Stipendiat Davide Porcellato

UMB

Abstract Norwegian:

Molekylær tilnærming til studier av bakterielle samfunn i meieriprodukter

Av stipendiat Davide Porcellato, Universitetet for miljø og biovitenskap

I løpet av de siste to tiårene har molekylære metoder blitt raskere, mer pålitelige og reproducerbare som verktøy for studier av bakterielle samfunn i meieriprodukter, sammenlignet med tradisjonelle fenotypiske og biokjemiske metoder som er både møysommelige, tidkrevende og ofte unøyaktige. Molekylær tilnærming for identifikasjon på arts- og stammenivå ved bruk av sekvensering og ulike typingsmetoder har blitt brukt i flere år på melkesyrebakterier. Referansemeter benyttet i molekylære studier er fortsatt å regne som meget kostbare og tidkrevende når det gjelder industriell anvendelse, mens nye molekylære metoder som høy oppløselig smeltepunktanalyse (HRM) har større potensial og kan brukes på store sett av prøver. HRM har nylig blitt anvendt på meieriprodukter og viste stor gjennomstrømning med hensyn til identifisering og typing av et stort antall meieriisolat.

Innenfor metoder til utforskning av mikrobiell sammensetning i komplekse samfunn som meieriprodukter, vil dyrkingsuavhengige metoder gi rask og omfattende informasjon sammenliknet med dyrkingsbaserte metoder. En av de mest brukte metodene for å studere mangfold av komplekse mikrobielle samfunn og for å overvåke deres dynamiske utvikling er denaturerende gradient gel elektroforese (DGGE). Prinsippet til DGGE er separasjon av polymerasekjede reaksjon (PCR) fragmenter i en denaturerende polyakrylamidgradient gel basert på fragmentenes denaturerende egenskaper. Denatureringsegenskapene til hvert fragment/amplicon får de til å migrere annerledes gjennom den denaturerende gradienten i polyakrylamidgelen, noe som resulterer i et unikt fingeravtrykk av bånd for hver gitte prøve. Hvert bånd kan anses som en enkel taksonomisk enhet (art) og kan bli sekvensert for å bestemme arter opprinnelig tilstede i prøven. Disse metodene unngår skjevheter forårsaket av oppdyrkingstrinnet og gir mer pålitelig informasjon om den totale bakterielle populasjonen tilstede i prøvene. Dyrkingsuavhengige metoder brukes også til kvantifiseringsformål ved bruk av "real-time" kvantitativ PCR (qPCR), som kan erstatte platetellingsmetoden. Molekylære metoder til studier av mikroflora i ulike meieriprodukt kan brukes for å unngå eller redusere bruk av tidkrevende og kostbare biokjemiske metoder som tradisjonelt benyttes i dag.

Abstract English:

Molecular approach for the study of bacterial community in dairy products

Since the last 2 decades molecular methods have become more rapid, reliable and reproducible tools for the study of bacterial community in dairy products compared to phenotypic and

biochemical methods which are laborious, time consuming and often inaccurate. Molecular approaches for identification at species and strain level as sequencing and typing methods have been applied for several years on lactic acid bacteria. The reference methods used in molecular studies are still considered very costly and time consuming for industrial application while new molecular methods, as high resolution melt analysis (HRM), have higher potential and are applicable to a large set of samples. The HRM has been recently applied to dairy products and showed greater throughput for identification and typing of a high number of dairy isolates.

Within the methods for exploring the microbial composition in complex systems such as dairy products, culture-independent methods provide fast and comprehensive information to cultivation-based methods. One of the most used methods to study the diversity of microbial systems and for monitoring their dynamic development is denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The principle of DGGE is a separation of a polymerase chain reaction (PCR) fragment mix in a denaturing gradient gel based on the single amplicons denaturing properties. The denaturing characteristics of each amplicon cause them to migrate differently through the denaturing gradient in the polyacrylamide gel, resulting in a unique fingerprint of bands for each given sample. Each band may be considered as a single taxonomic unit (specie) and sequenced in order to obtain species identification of the species originally present in the sample. These methods avoid the bias of the culturing step and give more reliable information on the whole bacterial population present in the samples. Culture-independent methods are also applied for quantification purpose by real-time qPCR which may substitute the plate counting method. Molecular approaches for the study of dairy samples may be used to avoid or reduce the usage of time consuming and expensive biochemical methods.

