

# POPOLAZIONE MICROBICA NEI CEREALI: INDAGINE SU DIFFERENTI TIPI DI CEREALI PROVENIENTI DA DIVERSE AREE GEOGRAFICHE

## ***MICROBIAL POPULATION IN CEREALS: SURVEY OF DIFFERENT CEREAL TYPES AND GEOGRAPHICAL LOCATIONS***

BAZZOLI A.<sup>1</sup>, BRAVO DE LAGUNA F.<sup>2</sup>, BRUNE F.<sup>2</sup>, COUTURE V.<sup>2</sup>, SAORNIL D.<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Lallemand Animal Nutrition, Italy - <sup>2</sup>Lallemand Animal Nutrition, France*

**Parole chiave:** Cereali, fermentazione, broda.

**Key words:** Cereals, fermentation, liquid feed.

**Riassunto:** Un totale di 66 campioni di tre tipi di cereali (mais, orzo e frumento), provenienti da differenti nazioni Europee sono stati analizzati per la microbiologia, secondo le procedure standard. E' stata osservata una variabilità molto elevata tra i differenti profili microbiologici, e in generale, tra le popolazioni microbiche analizzate, quella dei lattobacilli (LAB) era quella meno rappresentata, mentre la popolazione degli enterobatteri era molto alta. Tra le tipologie di cereali, l'orzo ha mostrato la più alta conta microbica totale e di enterobatteri in comparazione con frumento e mais. Il rapporto tra Log LAB : Log Enterobatteri è risultato inferiore a 1 per tutti e tre i tipi di cereale, e il rapporto medio più basso è stato osservato per l'orzo. Considerando l'origine geografica dei campioni, è stato osservato che i campioni provenienti dal Nord Europa, sono 10 volte più contaminati rispetto a quelli provenienti dal Centro e dal Sud Europa. Inoltre, il rapporto tra Log LAB : Log Enterobatteri è risultato inferiore per i campioni del Nord Europa, mentre maggiore in quelli del Sud Europa. In una seconda fase di questo progetto, sono stati selezionati 6 campioni (2 per tipo di cereale), in base al loro profilo microbiologico e successivamente sottoposti a fermentazione al fine di studiarne lo sviluppo microbiologico e per valutare l'effetto dell'aggiunta di un inoculo a base di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M sul profilo microbico.

**Abstract:** A total of 66 samples representing three different cereals (corn, barley and wheat) were collected in several countries across Europe. The samples were analyzed by standard microbiological procedures and characterized according to their microbial profile. There was a great variability between the microbial profile of the whole set of cereal samples. In general, the survey showed a low population of Lactic Acid Bacteria (LAB), while a much higher population of Enterobacteria. Between cereal types, the survey showed a higher total microflora level in barley samples as compared with wheat and corn, and the same pattern was found in the Enterobacteria level. The ratio Log LAB:Log Enterobacteria was found to be below 1 in the three cereals, the lowest average level found in the barley samples. Sorting by geographical origin of the samples, those coming from Northern Europe were found to host 10 times more microorganisms than those coming from Central and South Europe. The ratio Log LAB:Log Enterobacteria was found to be the lowest in the samples coming from North of Europe, and the highest in the samples coming from South of Europe. In a second step of this project 6 samples were selected according to their microbial profile and subjected to fermentation in order to study the microbial development depending on the initial microbial load and also the effect of the application of an inoculant based on *Pediococcus acidilactici* MA18/5M.

## INTRODUZIONE

Nell'alimentazione del suino all'ingrasso, il ricorso all'alimento liquido è diffuso e praticato in diversi paesi Europei. Questo tipo di somministrazione dell'alimento può essere ricondotto a due tipologie: alimento liquido non fermentato e alimento liquido fermentato. Il primo consiste nella miscela di materie prime secche, per la maggior parte cereali, con acqua e/o materie prime liquide e distribuito agli animali nell'arco di pochi minuti dalla preparazione. L'alimento liquido fermentato invece, prima di essere distribuito, viene lasciato fermentare per almeno 24 ore, al fine di aumentare la produzione di acido lattico e di abbassare la carica dei batteri potenzialmente patogeni [1,3,4,5]. Questo livello elevato di umidità innesca l'attività della flora microbica presente nelle materie prime ed i prodotti di queste fermentazioni microbiche possono essere molto variabili in base al tipo di microrganismi presenti nei vari componenti del mangime.[2,6]. La qualità igienica dell'alimento liquido può essere stimata valutando la sua carica microbica, un parametro molto importante ma spesso sottovalutato o ignorato[3,4,5].

La qualificazione batteriologica di una broda generalmente avviene attraverso l'analisi di:

- Lattobacilli: generalmente dominanti nella microflora epifitica dei cereali, essi hanno un generale effetto positivo producendo acido lattico, favorendo l'acidificazione progressiva dell'alimento liquido ed entrano rapidamente in competizione con la flora potenzialmente patogena nella vasca di preparazione [5], nel biofilm presente nell'impianto di distribuzione e anche a livello intestinale. E' importante tenere in considerazione tutto ciò poiché la qualità microbiologica di una broda è misurata sia in termini di quantità assoluta di ogni singola popolazione ma anche attraverso le relative proporzioni tra di esse. Per esempio, un alimento liquido molto ricco in lattobacilli contrasterà efficacemente un elevato numero di coliformi[5,9].

- Flora Gram negativa: tra questi generalmente vengono analizzati gli Enterobatteri, i Coliformi ( una sottopopolazione degli Enterobatteri ) e *Escherichia coli*, alcuni ceppi dei quali possono essere patogeni. I batteri Gram negativi sono importanti poiché sono in grado di produrre ammine biogene a partire da aminoacidi liberi. La produzione di queste ammine, potenzialmente tossiche, può avere effetti sull'ingestione di alimento ed influenzare la crescita degli animali, anche per la riduzione del livello di lisina nella broda [12].

- Lieviti: sono naturalmente presenti sulla superficie dei cereali [3] e possono colonizzare i biofilm. Il quantitativo di lieviti presenti può influenzare la qualità dell'alimento liquido. Quando le fermentazioni sono dominate dai lieviti sono stati riportati effetti sia positivi sia negativi, in funzione dei ceppi presenti [10,13]. Un'elevata concentrazione di lieviti può portare alla produzione di sapori e odori sgradevoli dovuti alla produzione di composti quali acido acetico, etanolo e alcool amilico che possono diminuire sia l'appetibilità sia il contenuto di sostanza secca ed energetico dell'alimento[8,11].

Lo scopo di questo studio era valutare la qualità microbiologica di differenti tipi di cereali, più comunemente utilizzati nell'alimentazione del suino e conseguentemente prevedere eventuali effetti positivi o negativi di questi sull'alimento liquido.

## MATERIALI E METODI:

Lo studio si è svolto nel Febbraio 2016 presso il laboratorio di ricerca e sviluppo di LALLEMAND ANIMAL NUTRITION, sito in Blagnac, Francia.

L'indagine ha riguardato l'analisi di tre tipi di cereali, per un totale di 66 campioni, così suddivisi: 31 di orzo, 22 di frumento e 13 di mais. Inoltre, i campioni, sono stati prelevati in diverse regioni Europee: 15 campioni dal Nord Europa ( Danimarca, Norvegia e Svezia), 37 da Europa centrale (Germania, Ungheria, Francia del Nord e Romania) e 14 campioni dal Sud Europa (Croazia, Italia e Sud della Francia). Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologica secondo le procedure standard per: Conta microrganismi aerobi totali

a 30°C (NF EN ISO 4833-1), Coliformi fecali (NF V 08-060), Enterobatteriacee a 37°C (NF V 08-054), Lattobacilli (ISO 15214), Lieviti (NF V 08-036) e Muffe (NF V 08-036).

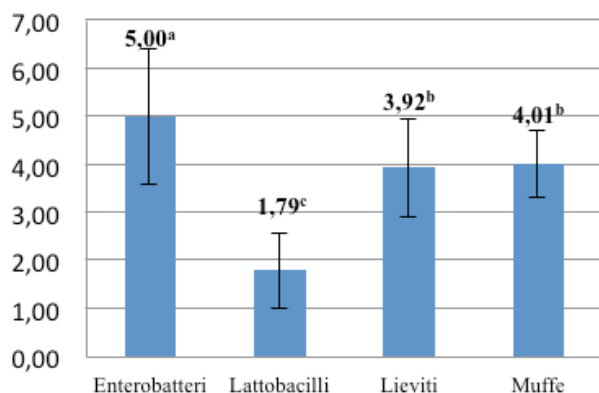
In una seconda fase, come studio preliminare, al fine di valutare l'influenza della flora epifitica dei cereali, sull'evoluzione fermentativa dell'alimento liquido, sono stati selezionati 2 campioni per ogni tipo di cereale. I campioni sono stati scelti in base al livello di flora totale e di enterobatteri, scegliendo quelli con la concentrazione più alta (Bassa qualità) e quelli con la concentrazione più bassa (Alta Qualità). I 6 campioni sono stati duplicati al fine di valutare anche l'effetto di un probiotico utilizzato come inoculo a base di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M. I campioni selezionati sono poi stati macinati con tritatore da laboratorio al fine di ottenere una polvere fine ed omogenea per poi essere miscelati con acqua ricreando due brode per ogni cereale selezionato: una senza aggiunta di *Pediococcus acidilactici* (342.86 g di cereale in 1200 ml di acqua) denominata "controllo" e una con aggiunta di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M (342.85 g di cereale +  $1.58 \times 10^{10}$  UFC/g in 1200 ml di acqua).

Un campione di 1 litro di ciascuna broda è stato inserito in un contenitore di vetro e posto in un contenitore per bagno maria, a temperatura controllata di  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  e lasciato fermentare per 24 ore. Le brode sono poi state analizzate microbiologicamente, all'inizio, a 3, 6 e 24 ore del test. Per le analisi sono state utilizzate le procedure microbiologiche standard per: Conta microrganismi aerobi totali a 30°C (NF EN ISO 4833-1), Coliformi fecali (NF V 08-060), Enterobatteriacee a 37°C (NF V 08-054), Lattobacilli (ISO 15214), Lieviti e Muffe (NF V 08-036) e *Pediococcus acidilactici* (ISO 15214).

Per l'analisi statistica è stato applicato il metodo GLM univariato.

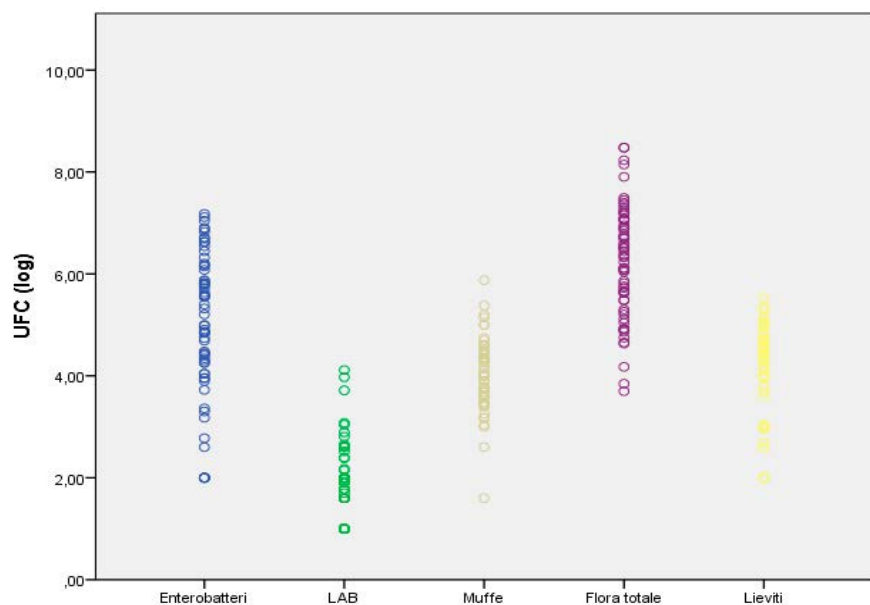
## RISULTATI E DISCUSSIONI:

### Analisi dei 66 campioni:



**Fig. 1: Popolazione microbica media dei 66 campioni di cereali espresse in Log ( $p < 0.001$ ).**

I dati riportati in figura 1 rappresentano la media delle diverse popolazioni microbiche dei 66 campioni analizzati. Come si può osservare le differenze tra queste sono significative, e la popolazione microbica dominante è rappresentata dagli enterobatteri. Invece, la popolazione meno rappresentata è risultata essere, quella dei lattobacilli mentre lieviti e muffe, statisticamente equivalenti tra di loro erano presenti ad un livello intermedio rispetto alle altre due popolazioni ( $p < 0.001$ ). Inoltre è interessante osservare che, tra i differenti campioni, c'è molta variabilità, ad esempio, gli enterobatteri variano da  $10^2$  UFC/g a  $10^7$  UFC/g mentre i lattobacilli (LAB) variano da  $10^0$  UFC/g a  $10^4$  UFC/g (Fig.2).

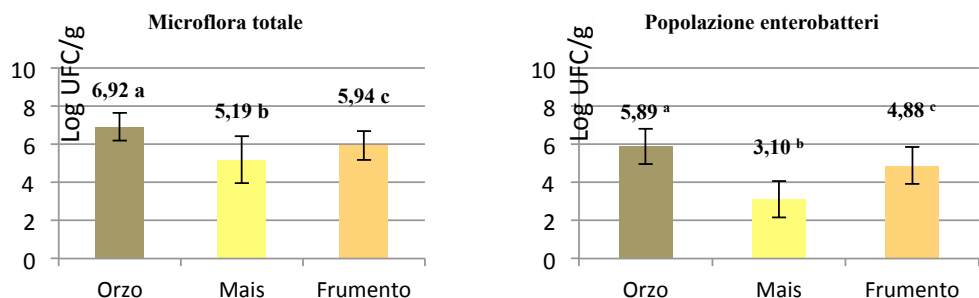


**Fig. 2: Distribuzione delle conte batteriche dei 66 campioni di cereali.**

**Distribuzione per tipo di cereale**

Variabili dipendenti	Cereale	Popolazione media (in Log)	Err. Stand.	P value
Flora Totale	Orzo	6,920 <sup>a</sup>	0,154	<0.001
	Mais	5,195 <sup>c</sup>	0,238	
	Frumento	5,939 <sup>b</sup>	0,183	
Enterobatteri	Orzo	5,891 <sup>a</sup>	0,171	<0.001
	Mais	3,101 <sup>c</sup>	0,264	
	Frumento	4,879 <sup>b</sup>	0,203	
LAB	Orzo	2,045 <sup>a</sup>	0,134	0.040
	Mais	1,548 <sup>b</sup>	0,207	
	Frumento	1,578 <sup>b</sup>	0,159	
Muffe	Orzo	4,152	0,122	0.194
	Mais	4,005	0,189	
	Frumento	3,804	0,145	
Lieviti	Orzo	4,267 <sup>b</sup>	0,169	0.003
	Mais	3,174 <sup>a</sup>	0,26	
	Frumento	3,876 <sup>b</sup>	0,2	

**Tab. 1: Popolazione microbica media dei 66 campioni in funzione del tipo di cereale.**



**Fig. 3: Microflora totale e conta enterobatteri nei 66 campioni per tipo di cereali ( $p < 0.001$ ).**

I tre cereali sono risultati significativamente differenti tra loro e, considerando la popolazione microbica totale, l'orzo risulta essere quello maggiormente contaminato, seguito dal frumento e dal mais. Le stesse differenze sono riscontrabili anche per gli enterobatteri (Fig.3), con almeno 3 Log di differenza tra orzo e mais ( $p < 0.001$ ). Per quanto riguarda i lattobacilli, nell'orzo la contaminazione è significativamente maggiore (vedi Tab. 1) rispetto a frumento e mais, mentre tra questi ultimi non vi sono differenze. Comunque sia, è interessante notare che per i lattobacilli, la differenza tra i campioni è minima con mezzo logaritmo di differenza massimo.

Nella preparazione delle brode è auspicabile favorire lo sviluppo di abbondante flora lattica, la quale è in grado di contrastare la crescita dei patogeni sia per competizione sia creando un ambiente sfavorevole grazie alla produzione di AGV con conseguente abbassamento del pH [2,6,7]. Al fine di valutare l'equilibrio tra le varie popolazioni ed in qualche modo determinare il "livello di rischio" dei cereali, abbiamo analizzato il rapporto tra batteri lattici, ed enterobatteri, potenzialmente negativi. Tutti i rapporti, calcolati come "Log LAB / Log Enterobatteri", sono risultati inferiori a 1 e ciò sta ad indicare che in ogni cereale la popolazione degli enterobatteri è dominante rispetto ai LAB (Tab. 2). Il mais è risultato avere un rapporto significativamente maggiore rispetto a frumento ed orzo ( $p < 0.01$ ), e su una ipotetica scala di rischio può essere considerato meno esposto a disfermentazioni, mentre l'orzo può essere considerato quello più a rischio.

Tipo	Rapporto Log LAB / Log Enterobatteri	Err. Stand.	P value
Orzo	0,358 <sup>b</sup>	0,032	0.010
Mais	0,526 <sup>a</sup>	0,050	
Frumento	0,341 <sup>b</sup>	0,038	

**Tab. 2: Rapporto Log LAB / Log Enterobatteri in funzione del tipo di cereali. Distribuzione per aree**

I 66 campioni sono stati divisi in 3 gruppi, in funzione della loro origine geografica e i risultati delle analisi sono rappresentati nella tabella 3.

Variabili dipendenti	Area	Popolazione media (in Log)	Err. Stand.	P value
Flora Totale	Nord Europa	7,183 <sup>a</sup>	0,252	<0.001
	Centro Europa	6,013 <sup>b</sup>	0,160	
	Sud Europa	5,891 <sup>b</sup>	0,261	
Enterobatteri	Nord Europa	6,270 <sup>a</sup>	0,319	<0.001
	Centro Europa	4,746 <sup>b</sup>	0,203	
	Sud Europa	4,332 <sup>b</sup>	0,33	
LAB	Nord Europa	1,847	0,199	0.314
	Centro Europa	1,676	0,127	
	Sud Europa	2,039	0,206	
Muffe	Nord Europa	4,448 <sup>a</sup>	0,163	0.002
	Centro Europa	3,767 <sup>b</sup>	0,104	
	Sud Europa	4,169 <sup>a</sup>	0,169	
Lieviti	Nord Europa	4,714 <sup>a</sup>	0,239	0.001
	Centro Europa	3,626 <sup>b</sup>	0,152	
	Sud Europa	3,852 <sup>b</sup>	0,247	

**Tab. 3: Popolazione microbica media dei 66 campioni in funzione dell'origine geografica.**

Osservando le medie delle 5 popolazioni microbiche nelle tre aree geografiche, è stato possibile trovare differenze significative per 4 di esse: microflora totale, enterobatteri, muffe e lieviti. E' interessante osservare, come queste 4 comunità microbiche, seguano lo stesso modello. Infatti, il Nord Europa è risultato essere significativamente più contaminato rispetto ai campioni delle altre regioni. Invece, i campioni del Centro Europa hanno mostrato delle contaminazioni solo numericamente maggiori per microflora totale ed enterobatteri rispetto a quelli del Sud Europa. Riguardo alla popolazione dei LAB, non vi sono differenze statisticamente significative tra le tre regioni, sebbene il Sud Europa sembrerebbe esserne numericamente più dotato.

Area	Rapporto Log LAB / Log Enterobatteri	Err. Stand.	P value
Nord Europa	0,293 <sup>b</sup>	0,030	0.020
Centro Europa	0,384 <sup>b</sup>	0,047	
Sud Europa	0,489 <sup>a</sup>	0,049	

**Tab. 4: Rapporto LogLAB / Log Enterobatteri in funzione dell'origine geografica.**

Valutando il rapporto Log LAB / Log Enterobatteri anche per origine geografica, è stato possibile osservare che tale rapporto nel Sud Europa è significativamente maggiore rispetto alle altre due macro regioni: ciò significa che nel Sud Europa, l'equilibrio microbico è a favore dei lattobacilli, pur restando, come per le altre regioni, inferiore a 1 (Tab.4).

### Seconda fase del progetto. Esempio dell'evoluzione fermentativa nell'orzo.

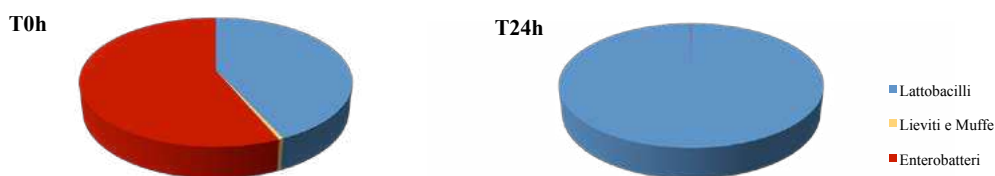
Nella seconda fase di questa indagine, come studio preliminare, è stato eseguito un test di fermentazione su 2 campioni per ogni tipo di cereale per valutare l'evoluzione fermentativa dell'alimento liquido. Di seguito, a titolo di esempio, riporteremo i risultati riguardanti un orzo di "scarsa qualità".

Nell'orzo definito di "scarsa qualità", dopo aver costituito la rispettiva broda, la popolazione degli enterobatteri, già da T0 era la popolazione dominante (Enterobatteri:  $2,7 \times 10^6$  ufc/g; LAB:  $3,9 \times 10^4$  ufc/g, Lieviti e Muffe:  $3,1 \times 10^4$  ufc/g) ed il trend si è mantenuto fino alla fine del processo. A 24 ore il rapporto tra le differenti popolazioni microbiche era ampiamente a favore degli enterobatteri (Enterobatteri:  $1,4 \times 10^8$  ufc/g; LAB:  $3,0 \times 10^7$  ufc/g, Lieviti e Muffe:  $8,7 \times 10^6$  ufc/g) (fig. 5).



**Fig. 5: Evoluzione della popolazione microbica della broda di un orzo di scarsa qualità da 0 a 24 ore.**

Nella stessa broda, nonostante la popolazione degli enterobatteri fosse dominante a T0, l'aggiunta di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M ha cambiato radicalmente il profilo microbico già dall'inizio del processo, bilanciando il rapporto tra lattobacilli ed enterobatteri (Enterobatteri:  $2,5 \times 10^6$  ufc/g; LAB:  $1,9 \times 10^6$  ufc/g, Lieviti e Muffe:  $2,1 \times 10^4$  ufc/g). Alla fine del processo, il profilo microbico è risultato completamente invertito: i lattobacilli infatti erano dominanti (Enterobatteri:  $6,3 \times 10^6$  ufc/g; LAB:  $5,9 \times 10^9$  ufc/g, Lieviti e Muffe:  $4,1 \times 10^5$  ufc/g) (Fig. 6).



**Fig. 6: Evoluzione della popolazione microbica della broda di un orzo di scarsa qualità da 0 a 24 ore con l'aggiunta di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M.**

### CONCLUSIONI:

Le popolazioni microbiche presenti sulla superficie dei cereali sono risultate molto variabili tra di loro e questo rende difficile predire la qualità microbiologica di quest'ultimi. Tra i differenti tipi di cereali, l'orzo è risultato il più contaminato e sembrerebbe essere quello più a rischio, a causa della più alta popolazione di enterobatteri e per il minor rapporto tra lattobacilli ed enterobatteri.

Il rapporto tra lattobacilli ed enterobatteri è un parametro importante che può essere

utilizzato per definire la qualità microbiologica dei cereali. Per i differenti cereali analizzati nell'indagine, il rapporto è risultato a favore della popolazione degli enterobatteri per tutti e tre i cereali, mostrando un potenziale rischio di disfermentazioni nell'alimento liquido ma anche nei tubi o successivamente nella creazione del biofilm dell'impianto di alimentazione. E' altresì da sottolineare, che il mais sembrerebbe essere il cereale a minor rischio rispetto ad orzo e frumento.

Geograficamente, i campioni provenienti dal Nord Europa hanno mostrato una qualità microbiologica inferiore rispetto a campioni provenienti dal Centro e Sud Europa.

Per ovviare al rapporto negativo tra lattobacilli ed enterobatteri, l'applicazione di un inoculo probiotico, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, come mostrato in un esempio sull'orzo, pare essere uno strumento efficiente per bilanciare il profilo microbico di differenti materie prime già dall'inizio del processo fermentativo. Comunque sia, essendo un test preliminare, ulteriori ricerche devono essere svolte in questo campo, per confermare i dati ottenuti.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Brooks P.H., Beal J.D. (2005), "Liquid feeding of pigs: implication for pig and human health", Proceedings of the 2005 Manitoba Swine Seminar
2. Brooks P.H., Beal J.D., Niven S. (2001), "Liquid feeding of pigs: potential to reducing environmental impact and for improving productivity and food safety", Recent advance in animal nutrition in Australia Vol. 13, 49-63.
3. Brooks, P.H. (2008) "Fermented liquid feed for pigs", CAB rev; 3, n° 73, 18.
4. Canibe, N., Jensen, B.B. (2003) "Fermented and non-fermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance". J Anim Sci.; 81, 2019-31.
5. Canibe, N., Jensen, B.B. (2012) "Fermented liquid feed – microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases of pigs" Anim. Feed Sci. Technol.; 173, 17-40.
6. Dujardin M., Elain A., Lendormi T., Le Fellic M., Le Treut Y., Sire O. (2014), "Keeping under control a liquid feed fermentation process for pigs: A reality scale pilot based study", Animal Feed Science and Technology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.04.017>
7. Fantinati P. (2008), "Così l'alimentazione liquida difende la salute dei suini", Suinicoltura 2, 40-46.
8. Jensen, B.B., Mikkelsen, L.L. (1998) "Feeding liquid diets to pigs". In: Garnsworthy PC, Wiseman J, editors. Recent advances in animal nutrition 1998. Nottingham University Press, Nottingham, UK; 107-26.
9. Le Treut Y. (2010), «Principes et intérêts de la soupe fermentée en alimentation porcine», Comunicazione personale.
10. Missotten, J., Michiels, J., Olyn, A., De Smet, S., Dierick, N.A. (2010) "Fermented liquid feed for pigs", Arch. Anim. Nutr., 64, 437-66.
11. Missotten, J., Michiels, J., Degroote, J., De Smet, S. (2015) "Fermented liquid feed for pigs: an ancient technique for the future" Journal of Animal Science and Biotechnology, 6:4.
12. Niven, S.J., Beal, J.D., Brooks, P.H. (2006) "The effect of controlled fermentation on the fate of synthetic lysine in liquid diets for pigs". Anim Feed Sci Technol.; 119:304-315.
13. Olstorpe M., Karin L., Lindberg J.E., Schnurer J., Passoth V. (2008), "Population diversity of lactic acid bacteria in pig fermented with whey, wet wheat distillers' grains or water at different temperatures", Appl. Environ. Microbiol. vol. 74 n° 6, 1696-1703.