



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

Elaborato di Laurea Magistrale
in
Biotecnologie per l'alimentazione

Analisi fenotipica e molecolare della persistenza di *Pseudomonas fluorescens* in colture a lungo termine

Relatore: Prof.ssa Barbara Cardazzo

Laureando: Matteo Meneghello
Matricola: 2063902

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

Abstract.....	1
1. Introduzione.....	3
1.1. Storia del genere <i>Pseudomonas</i> e classificazione	3
1.2. Caratteristiche generali del genere <i>Pseudomonas</i>	5
1.3. <i>Spoilage</i> degli alimenti	6
1.4. Alterazione prodotta da <i>Pseudomonas</i>	7
1.5. Colorazione anomala da pigmento: il caso delle mozzarelle blu	9
1.6. Crescita batterica	9
1.7. Forme di adattamento batteriche.....	10
1.7.1. Persistenza e resistenza	10
1.7.2. Meccanismi molecolari persistenza	12
1.7.2.1. Sistema tossina-antitossina (TA).....	12
1.7.2.2. Risposta stringente da mancanza di nutrienti	14
1.7.2.3. Interazione tra i due sistemi	16
1.7.3. Stato " <i>Viable But Not Culturable</i> " (VBNC).....	16
1.7.4. Biofilm	17
1.7.5. <i>Quorum sensing</i>	18
2. Obiettivi.....	19
3. Materiali e metodi	21
3.1. Ceppi batterici	21
3.2. Preparazione delle <i>long term cultures</i>	21
3.3. Schema dell'esperimento.....	22
3.4. Generazione curve di crescita	23
3.5. Lettura allo spettrofotometro	24
3.6. Test del biofilm.....	24
3.7. Motilità.....	26
3.8. Identificazione dei <i>persisters</i>	27
3.9. Utilizzo colorante PMAxx: amplificazione selettiva cellule vitali.....	28
3.10. Estrazione DNA batterico	28
3.11. <i>Real time PCR</i>	29
3.12. Soluzioni e terreni	30
4. Risultati	33
4.1. Determinazione delle curve di crescita	33
4.1.1. Conte cellulari ceppo CECT 378 a 4 °C e a 22°C.....	34
4.1.2. Conte cellulari ceppo L3_4 a 4 °C e a 22°C.....	35
4.1.3. Monitoraggio uk1 alle temperature di 4 °C e 22°C	36
4.1.4. Confronto delle crescite batteriche dei tre ceppi a 4 °C	37
4.1.5. Confronto delle crescite batteriche dei tre ceppi a 22 °C	38
4.1.6. Valutazione della concentrazione batterica con Real Time PCR	39
4.2. Valutazione della capacità di formare biofilm.....	46
4.2.1. Capacità di formare biofilm a 4 °C.....	46
4.2.2. Capacità di formare biofilm a 22 °C.....	48
4.3. Identificazione dei <i>persisters</i>	51
4.4. Valutazione della motilità.....	52
4.4.1. Risultati <i>swimming</i> 4 °C e 22 °C.....	52
4.4.2. Risultati <i>swarming</i> 4 °C e 22 °C	56
5. Discussione	61
5.1. La crescita microbica in <i>long terms cultures</i>	61
5.2. La capacità di formare biofilm nelle <i>long term cultures</i>	63
5.3. La presenza di <i>persisters</i> nelle <i>long term cultures</i>	64

5.4. La motilità nelle <i>long term cultures</i>	64
6. Prospettive future	67
Allegato 1.....	69
Allegato 2.....	75
Allegato 3.....	78
Allegato 4.....	79
Allegato 5.....	81
Ringraziamenti.....	83
Bibliografia	85

Abstract

Pseudomonas fluorescens è un batterio di grande interesse per l'industria alimentare in quanto causa alterazione degli alimenti. Si trova sia sulle superfici che sugli utensili ed è in grado di crescere con range di pH e temperature molto vari. È, inoltre, in grado di produrre biofilm rendendo difficile la sua eliminazione. Gli studi sulla persistenza di *Pseudomonas* sono sempre più presenti e fondamentali per capire i meccanismi di sopravvivenza di questo alterante al fine di poter attuare le giuste misure preventive e correttive lungo l'intera filiera. Questa tesi si pone come scopo quello di approfondire i processi di persistenza con l'uso di colture a lungo termine in terreno minimo. In particolare, sono stati svolti due studi con due valori di temperature diverse (4 °C e 22 °C), seguiti nel tempo fino a 180 giorni. Per gli studi sono stati analizzati 3 ceppi distinti in contemporanea, uno di riferimento (CECT 378) e due isolati da alimenti (L3_4 e UK). In particolare, sono stati valutati nel tempo la crescita batterica, la capacità di produrre biofilm, la motilità, la frazione di persistere indotti da trattamento con antibiotico (kanamicina), la frazione delle VBNC tramite PMAxx e qPCR. I risultati ottenuti hanno permesso di confermare la capacità di *Pseudomonas* di mantenersi vitale e di persistere per lunghi periodi di tempo anche in condizioni molto limitanti.

1. Introduzione

1.1. Storia del genere *Pseudomonas* e classificazione

La classificazione attuale per *Pseudomonas* vede: Famiglia *Pseudomonadaceae*, Ordine *Pseudomonadales*, Classe *Gammaproteobacteria*, Phylum *Pseudomonadota*, Regno *Bacteria*, Dominio *Prokaryota* (Silby et al., 2011; taxonomy, 2014). L'arrivo all'attuale classificazione è frutto di un processo lungo e che ha visto una serie di passaggi qui di seguito riassunti.

Il nome *Pseudomonas* è stato utilizzato per la prima volta alla fine del XIX secolo dal professor Migula dell'Istituto di Karlsruhe in Germania. All'epoca le classificazioni erano basate sulle caratteristiche macro e microscopiche, in particolare venne data una breve descrizione dove si parlava di cellule con organi polari di motilità, in grado in alcune categorie di produrre spore (Palleroni, 2010). A partire dal XX secolo alla morfologia si aggiunsero come criteri base per la tassonomia batterica le caratteristiche fisiologiche. Nel Manuale di Bergey, pubblicato nel 1923, alla morfologia furono aggiunte diverse caratteristiche fenotipiche (ad esempio: colorazione di Gram, tipo di flagello, metabolismo con ossigeno) con lo scopo di differenziare le varie specie del genere *Pseudomonas* (Peix et al., 2009).

La classificazione basata su caratteristiche non di tipo molecolare portò un enorme numero di specie assegnate al genere *Pseudomonas*. Infatti, secondo una stima approssimativa, verso la metà del XX secolo esistevano più di 800 nomi di specie assegnati a questo genere (Palleroni, 2010).

Con lo sviluppo delle tecniche basate sul DNA si iniziò ad usare nella tassonomia batterica la composizione in basi del DNA (G + C) e l'ibridazione DNA-DNA. Questo permise una prima riorganizzazione del genere: nel Manuale di Bergey del 1974 è incluso il contenuto di G + C di tutte le specie di *Pseudomonas* (Peix et al., 2018).

A partire dagli anni '80 si sono verificati profondi cambiamenti: si è proposta l'analisi delle sequenze del gene 16S per la classificazione dei batteri. Questo ha collocato il genere *Pseudomonas* nei Gamma Proteobacteria (Woese et al., 1984). L'RNA 16S ha rivoluzionato la classificazione batterica, ma essendo altamente conservato non è sempre efficace. Per questo motivo si sono utilizzati molti geni *housekeeping* (es: *gyrB*, *rpoD*, *atpD*, *carA*, *recA*) per identificare le varie specie di *Pseudomonas* (Yamamoto et al., 2000; Hilario et al., 2004).

In particolare, un ulteriore sequenziamento di quattro geni *housekeeping* fondamentali (16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*) ha permesso di discriminare due lignaggi: *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*. Il primo *lineage* è stato suddiviso in tre gruppi principali con le specie *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* e *P. oleovorans* (Figura 1). Il *lineage* *P. fluorescens* è invece suddiviso in sei gruppi, rappresentati dalle specie: *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* e *P. straminea* (Figura 2) (Mulet et al., 2010).

Attualmente sono conosciute 316 specie di *Pseudomonas* (Genus: *Pseudomonas*, n.d.).

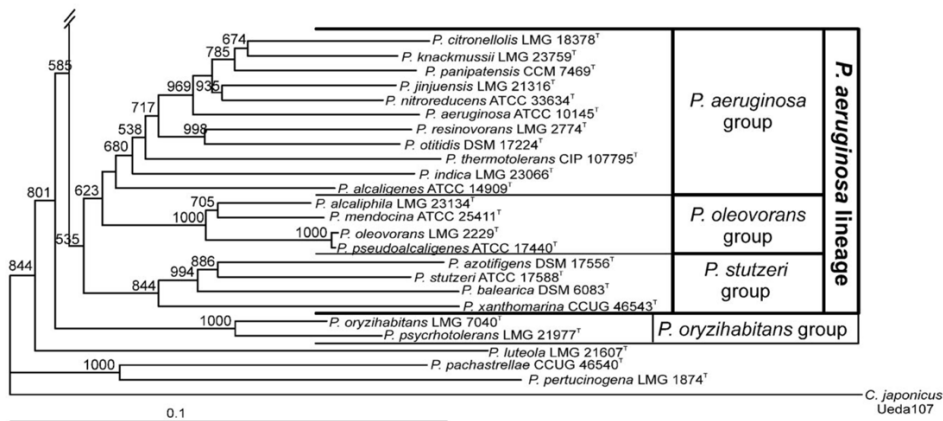


Figura 1 Albero filogenetico *P. aeruginosa* group, (Mulet et al., 2010).

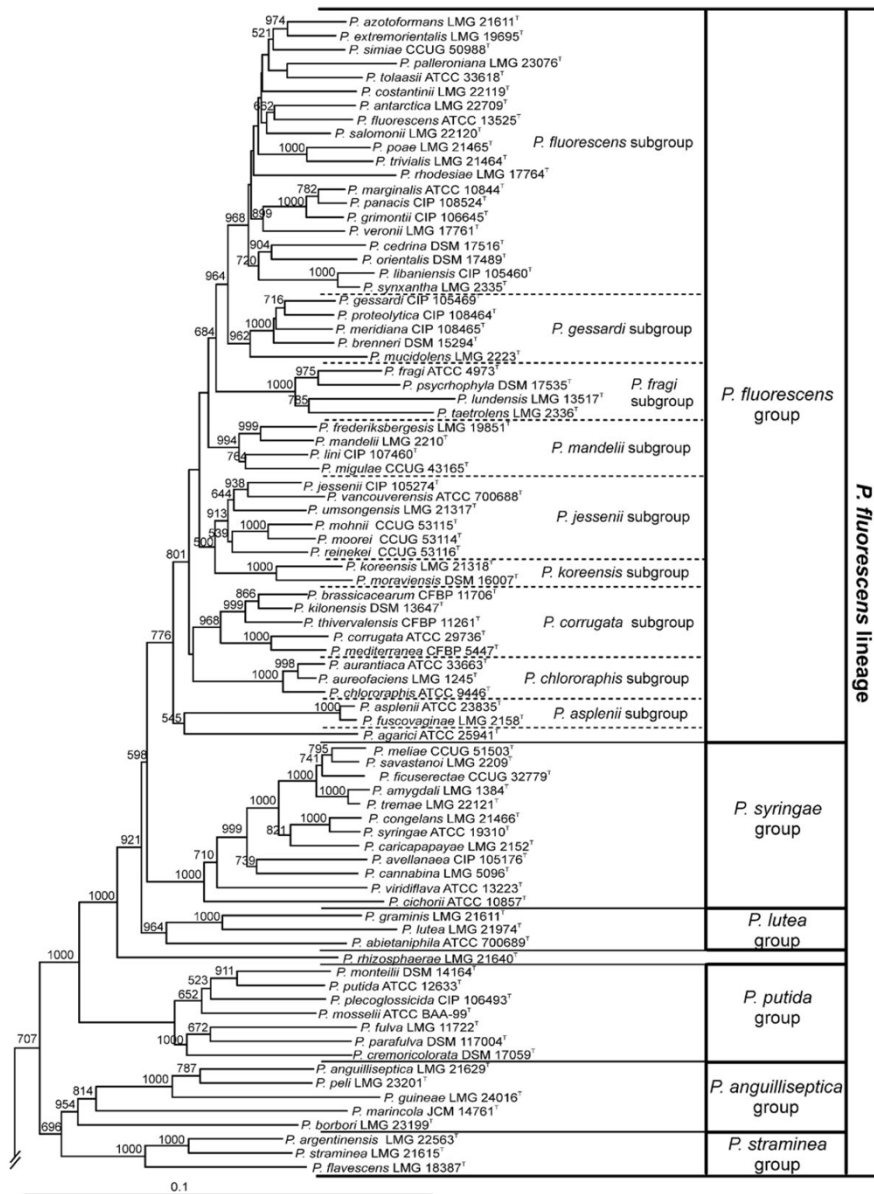


Figura 2 Albero filogenetico *P. fluorescens* group, (Mulet et al., 2010).

1.2. Caratteristiche generali del genere *Pseudomonas*

All'interno del genere *Pseudomonas*, come visto in precedenza, sono presenti membri con notevole versatilità metabolica e fisiologica. Questa duttilità permette la colonizzazione di vari habitat, sia terrestri che acquatici. Il genere è centrale per l'importanza nelle malattie delle piante e dell'uomo, per il ruolo da protagonista come food spoilage e per il crescente potenziale nelle applicazioni biotecnologiche (Figura 3) (Silby et al., 2011).

Si tratta di un batterio Gram-negativo con le seguenti caratteristiche: ha forma bastoncellare, è un aerobio obbligato, è catalasi e ossidasi positivo, è mobile grazie alla presenza di uno o più flagelli polari, è asporigeno in quanto non forma spore. Dal punto di vista metabolico non è in grado di fermentare il lattosio e non produce gas da glucosio (Bergey et al., 1984).

È un batterio psicrotrofo in quanto è in grado di crescere anche alle temperature di refrigerazione, con tempi di duplicazione ogni 4 ore sotto i 7 °C. Il suo range di temperatura va dai 4 °C ai 43 °C, l'intervallo ottimale di crescita è tra i 25°C e i 35°C.

Il range di pH in cui lo si trova va da 4,5 a 9,5 (Klein et al., 2008).

I suoi habitat sono dati da: suolo, acqua, superfici vegetali e animali. Grazie all'ampio range di temperatura e pH, alle esigenze nutrizionali molto semplici e alla capacità di produrre enzimi termostabili è ubiquitario nell'ambiente.

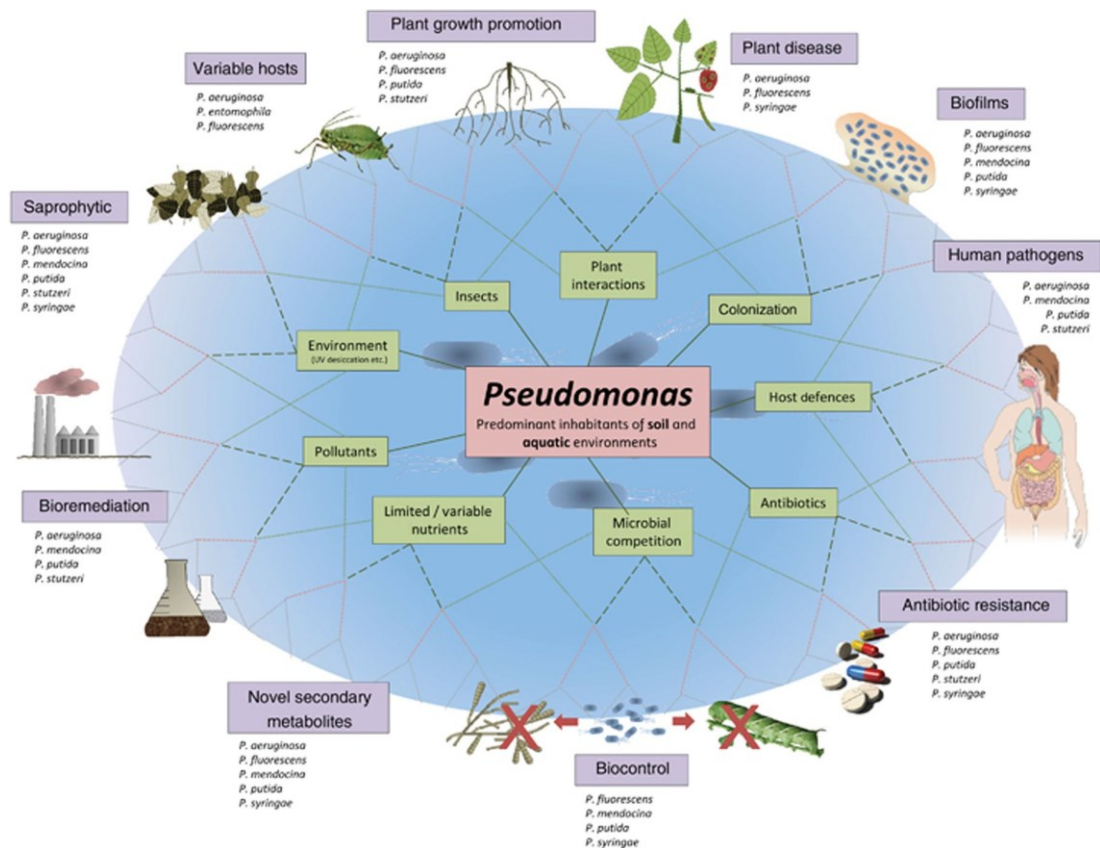


Figura 3 Range funzionale e ambientale di *Pseudomonas* spp. (Silby et al., 2011).

1.3. Spoilage degli alimenti

Il deterioramento degli alimenti consiste in un qualsiasi cambiamento in un prodotto alimentare che lo rende inaccettabile per il consumatore dal punto di vista sensoriale. Al suo interno è possibile trovare: danni fisici, cambiamenti chimici (ossidazione, cambiamenti colore, ecc.), comparsa di sapori e odori sgradevoli dovuti alla crescita e al metabolismo microbico nel prodotto (Gram et al., 2002).

A causa dello *spoilage* degli alimenti ogni anno si subiscono ingenti danni economici: l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura ha stimato che ogni anno si perdono 1,3 miliardi di tonnellate di prodotti alimentari (Cichello, 2014). Si stima che circa il 25% di tutti gli alimenti prodotti a livello globale vada perso a causa del deterioramento microbico (Bondi et al., 2014). Da questi dati risulta evidente come risulti essere uno dei problemi centrali della società odierna.

I principali fattori che sono coinvolti nel deterioramento degli alimenti sono suddivisi in due gruppi: decomposizione naturale (per perdita umidità o per azione enzimi endogeni) e contaminazione da microrganismi (batteri, muffe e lieviti).

Il deterioramento microbico è la causa più comune di *spoilage* (Bevilacqua et al., 2016). È un processo metabolico complesso e dinamico che rende gli alimenti indesiderabili per il consumo umano. Questo si verifica a causa di cambiamenti nelle caratteristiche sensoriali che comprendono: cambiamenti di consistenza, produzione di odori, alterazioni nel gusto e nell'aspetto. I cibi alterati generalmente non causano malattie in quanto non sono presenti patogeni o tossine, ma vengono rifiutati per le loro caratteristiche (Rawat, 2015).

Gli elementi che rendono l'alimento non più appetibile sono:

- cambiamenti di colore con produzione pigmenti, anche fluorescenti;
- cambiamenti di odore dovuti a H₂S e composti solforati, chetoni, ecc.;
- modificazione della consistenza;
- formazione di slime (mucopolisaccaridi);
- sviluppo di gas (principalmente CO₂ ma anche altri) o schiuma;
- accumulo di liquido (essudato).

In ogni caso è importante ricordare che il deterioramento è un processo multifattoriale che include: i fattori intrinseci (pH, A_w, ecc.) ed estrinseci (temperatura, umidità, comunità microbica, ecc.) e le contaminazioni. Per quest'ultime sono importanti la tipologia dei microrganismi coinvolti e la loro carica microbica. Il tutto si ripercuote nell'ecosistema alimento e nella sua *shelf-life*.

Le alterazioni microbiche possono essere classificate in base ai prodotti che vengono rilasciati nell'alimento. Si parla, quindi, di:

- putrefazione quando si ha la produzione di amine biogene, NH₃, CO₂, H₂S, CH₃SH, (CH₃)₂S, indolo, urea, ecc.;
- fermentazione con acidi, alcoli e CO₂;
- irrancimento con lo sviluppo di aldeidi, chetoni, alcoli, ossiacidi, idrocarburi.

1.4.Alterazione prodotta da *Pseudomonas*

La grande capacità di adattamento, l'ubiquitarietà e l'abilità di crescere a temperature di refrigeramento rende i batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* centrali nella degradazione di vari prodotti alimentari. I prodotti coinvolti comprendono: latte e prodotti lattiero caseari, verdure pronte al consumo, carne, pesce. (Kumar et al., 2019).

Le alterazioni possono essere suddivise in tre categorie con la produzione di: enzimi termostabili (come proteasi, lipasi e lecitinasi), pigmenti di varie tipologie, composti aromatici e molecole a basso peso molecolare (Figura 4).

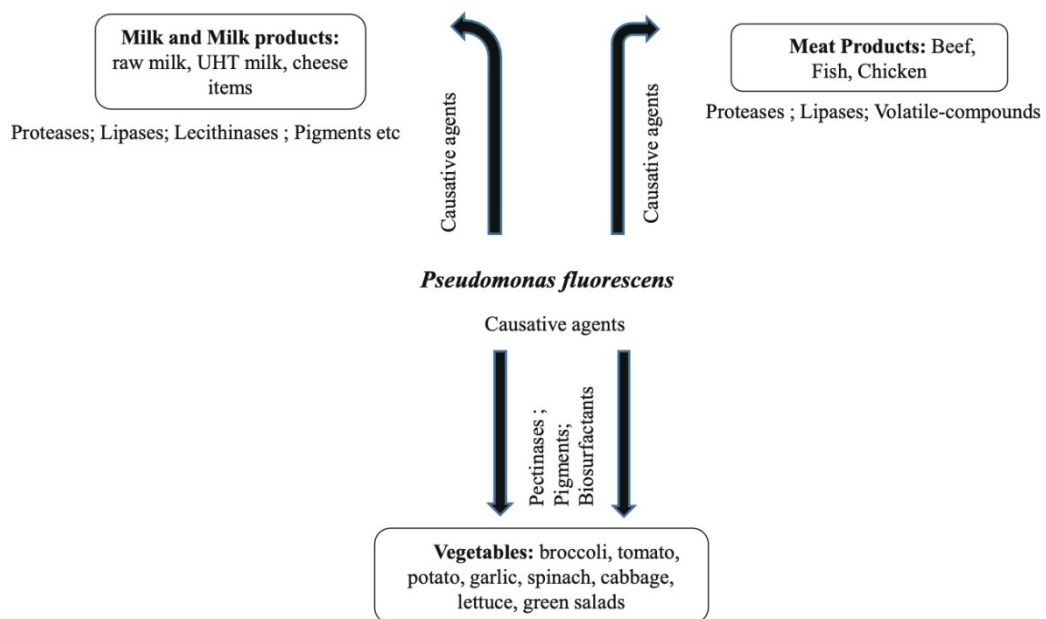


Figura 4 Alterazione di diversi alimenti da parte di *Pseudomonas fluorescens* (Kumar et al., 2019).

È importante notare che in molti casi l'alterazione può avvenire anche dopo la morte del batterio stesso. *Pseudomonas* è infatti molto sensibile alle temperature, ma i suoi enzimi sono spesso termoresistenti: trattamenti termici di 5 minuti a 100 °C portano alla lisi cellulare con rilascio degli enzimi che rimangono però stabili, solo con un trattamento a 121 °C per 20 minuti si produce una riduzione della loro attività (Rajmohan et al., 2002). Questo risulta spesso un problema negli alimenti in cui è necessario il mantenimento della catena del freddo, come latte e prodotti lattiero-caseari, che vengono spesso degradati da enzimi idrolitici extracellulari termostabili (Meer et al., 1991).

Le lipasi agiscono sulle molecole di grasso alimentare e provocano il rilascio di glicerolo insaturo e di acidi grassi. In questa fase un ruolo viene svolto anche dalle lecitinasi: sono in grado di degradare le membrane dei globuli di grasso del latte facilitando l'attacco delle lipasi stesse (Kumar et al., 2019). I grassi insaturi a catena corta liberi sono associati a sapori sgradevoli/rancidi, mentre i grassi insaturi a catena media sono associati a sapori amari/schiumosi. Nel formaggio, in particolare, le lipasi vengono assorbite all'interno dei globuli di grasso dove permeano provocando effetti di degradazione durante la maturazione del prodotto (Samaržija et al., 2012). Anche nella carne le lipasi scindono i gliceridi

formando acidi grassi liberi, che producono un cattivo sapore spesso definito irrancidimento (Huis, 1996).

Le proteinasi sono in grado di provocare la gelificazione del latte provocando la scissione della k-caseina in para-caseina. Un evento simile si verifica durante la produzione dei formaggi grazie all'azione del caglio, in tal caso voluta. Questa modificazione della caseina è favorita anche dall'attività delle proteinasi del latte (endogene), in particolare della plasmina (Kumar et al., 2019). Le varie proteinasi possono destabilizzare la caseina influenzando la resa casearia: in particolare plasminogeno e plasmina vengono liberati dalle micelle di caseina portando ad alterazioni della resa, oltre che influenzando consistenza e sapore del prodotto finale (Samaržija et al. 2012).

Molti dei ceppi di *P. fluorescens* hanno azione di tipo proteolitica: in particolare, un recente studio di analisi fenotipica, ha dimostrato come un'elevata quota delle specie di *P. fluorescens* sia in grado di stimolare la proteolisi su piastre di agar nutritivo con latte UHT al 2% a 22 °C, inoltre una buona parte (quasi ¾ delle specie analizzate) può svolgere questa azione anche a temperature di refrigerazione (Andreani et al., 2014).

L'altra grande alterazione di cui *P. fluorescens* è protagonista è la produzione di pigmenti idrosolubili, a volte fluorescenti (Andreani et al., 2014). I principali pigmenti prodotti sono di vari colori e comprendono: pioverdina (verde-giallo fluorescente), lemonnierina (giallo-arancio), piocianina (verde scuro), pseudobactina (giallo), piomelanina (nero) indigoidina (indaco) (Figura 5). Questi pigmenti sono in grado di legare il ferro formando un complesso stabile, e rendendolo così disponibile per il batterio stesso a sfavore degli altri microrganismi presenti in competizione (Meyer & Abdallah, 1978).

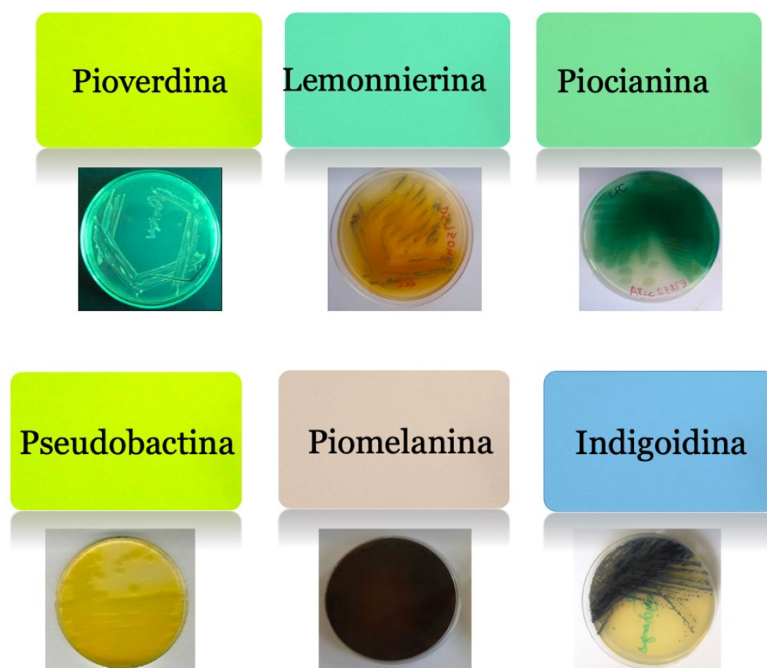


Figura 5 Colorazione dei pigmenti prodotti da *P. fluorescens*.

1.5. Colorazione anomala da pigmento: il caso delle mozzarelle blu

Uno dei maggiori eventi di *spoilage* alimentare causati da questo batterio si è verificato in Italia tra giugno e settembre del 2010: si sono osservate alterazioni di tipo organolettico (macchie e colorazione blu) su mozzarelle prodotte in Germania ed in Italia in seguito all'apertura delle confezioni (Kumar et al., 2019).

Il territorio italiano fu quello più colpito, ma ci furono casi in tutta Europa per un totale di 70.000 mozzarelle ritirate dal mercato, come riportato nel report annuale del Sistema di Allerta Rapido per Alimenti e Mangimi (RASFF).

In seguito, grazie alle analisi svolte, si scoprì che i responsabili della colorazione anomala erano 2 ceppi, *P. tolaasii* and *P. libanensis*, del gruppo *fluorescens*. Quest'ultimi erano presenti all'interno dell'acqua utilizzata per la produzione della mozzarella stessa (Andreani, et al., 2014).

Successivamente in uno studio è stata indicata l'indigoidina quale composto responsabile della colorazione fosse l'indigoidina (Caputo et al., 2015). In seguito, altri studi hanno invece dimostrato che la tonalità blu non era dovuta all'indigoidina, ma ad un indigo-derivato (Andreani, 2015) e che i geni responsabili della produzione del pigmento blu potrebbero avere un ruolo nella via biosintetica del triptofano oltre che fornire una protezione antiossidante (Andreani et al. 2019).

1.6. Crescita batterica

La crescita batterica vede la continua divisione di una cellula al fine di generare due cellule figlie identiche. I tempi di replicazione sono differenti tra i vari batteri, ma generalmente tutte le specie presentano la stessa curva di crescita che è composta da cinque distinte fasi (Figura 6):

-*lag phase*: fase iniziale di adattamento, caratterizzata dall'assenza di crescita;

-*log phase*: avviene in seguito all'adattamento dei batteri, è una fase di crescita esponenziale nella quale vengono sfruttati tutti i nutrienti presenti nel terreno;

-*stationary phase*: si verifica quando si esauriscono i nutrimenti del terreno. In questa fase i batteri non crescono ed iniziano a morire;

-*death phase*: si ha la morte di un gran numero di cellule per l'assenza di nutrienti e per la presenza di cataboliti tossici;

-*long-term stationary phase*: ci entra la porzione di cellule che riesce a sopravvivere grazie ai nutrimenti rilasciati dalle cellule morte. Questa è la fase che può portare allo sviluppo dei *persisters* e può avere una durata varia, anche di anni (Pletnev et al., 2015).

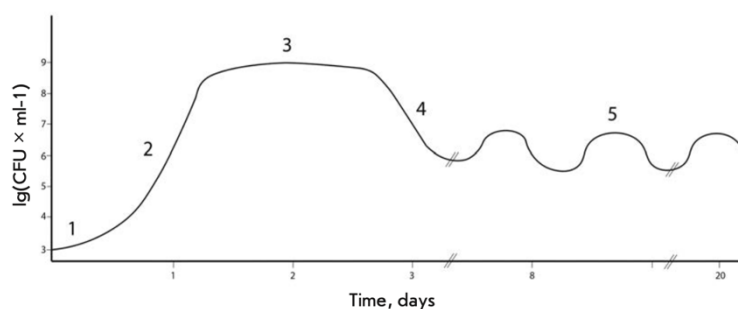


Figura 6 Grafico che mostra la curva di crescita di una popolazione batterica: 1-lag phase, 2-log phase, 3-stationary phase, 4-death phase, 5-long term stationary phase (Pletnev et al., 2015).

1.7. Forme di adattamento batteriche

L'evoluzione ha portato i batteri a sviluppare una grande capacità di adattamento, con lo scopo di permettere la loro sopravvivenza in ambienti che subiscono continui cambiamenti. Questa adattabilità possiede la caratteristica fondamentale di essere rapida al fine di essere sempre il più efficiente possibile.

La capacità di attuare uno stato di dormienza risulta essere una delle metodologie più efficaci oltre che interessanti: si tratta di uno stato vitale nel quale l'attività metabolica è molto ridotta e la crescita è assente o quasi nulla. All'interno della dormienza sono presenti due condizioni differenti: la forma di persistenza batterica e lo stato vitale, ma non coltivabile (VBNC). In ogni caso, questi stati vengono messi in atto quando i microrganismi si trovano in condizioni ambientali non adatte e che portano a stress, solitamente la dormienza viene abbandonata per un ritorno alla normale crescita quando si ripresentano le adatte condizioni ambientali (Ayrapetyan et al., 2018).

Un'altra fondamentale forma di resistenza è la capacità di formare biofilm: comunità multicellulari che vengono tenute insieme da una matrice extracellulare autoprodotta (López et al., 2010). Risulta infine importante menzionare anche il *quorum sensing*: meccanismo che molte cellule batteriche utilizzano per comunicare tra di loro, fondamentale per attuare forme di adattamento, tra cui il biofilm stesso (Mukherjee & Bassler, 2019).

1.7.1. Persistenza e resistenza

Lo stato di *persistenter* è stato riscontrato, in ambito clinico, successivamente alla scoperta e all'utilizzo degli antibiotici. In particolare, la terminologia "cellule persistenti" è stata utilizzata per la prima volta nel 1944 da Joseph Bigger: definì come persistenti le cellule di *Staphylococcus aureus* che erano sopravvissute ad un trattamento con la penicillina anche se appartenevano ad una popolazione suscettibile. In seguito al trattamento si originava una popolazione sensibile all'antibiotico, ma con una parte di cellule ancora tolleranti (Van den Bergh et al., 2017).

La condizione di *persistenter* è stata identificata in quasi tutte le specie batteriche, con porzioni della popolazione tra lo 0,001% e l'1% in questo stato transiente. Si hanno avuto riscontri anche in popolazioni di microrganismi eucarioti, come il lievito, che ha mostrato tolleranza agli antimicotici (Van den Bergh et al., 2017).

Questo stato, in ambito medico, è spesso associato ad un fallimento della terapia per ciò che riguarda i principali patogeni microbici come: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* uropatogeno e *Candida albicans*. In modo particolare quando questi patogeni riescono ad eludere il sistema immunitario, ad esempio grazie alla formazione di biofilm, risultano molto difficili da eliminare nonostante un trattamento antibiotico prolungato (Wilmaerts et al., 2019).

Si possono definire come persistenti quelle cellule che formano una sottopopolazione tollerante, con crescita lenta o assente, in seguito ad uno stress che può essere ad esempio un trattamento con antibiotico (Fisher et al., 2017). Le colture con cellule persistenti, quindi, vedono la presenza di varianti transitorie e fenotipiche all'interno di una popolazione suscettibile, questo permette alle

persistenti di sopravvivere in seguito al trattamento con dosi letali di antibiotici (Van den Bergh et al., 2017).

È stato osservato che alcune comunità di *E. coli* sono riuscite a sopravvivere per 3 anni in condizioni di scarsità di risorse durante la *Long-Term Stationary Phase*. Questa abilità di sopravvivenza in assenza di nutrienti è anche attribuita al fatto che le cellule morte rilasciano nutrienti, i quali possono essere utilizzati dalle altre cellule sopravvissute per garantire la loro stessa sopravvivenza (Arunasri et al., 2014).

È importante non confondere la persistenza con la resistenza in quanto sono due concetti in realtà molto differenti. Quando si parla di antibiotico resistenza si intende la capacità di una popolazione di batteri di crescere in presenza di antibiotici, questo avviene grazie a una modifica genetica acquisita che consente la sopravvivenza (Fisher et al., 2017).

Le cellule resistenti sono in grado di replicare in presenza di un agente battericida mentre le cellule persistenti no, possono tornare a moltiplicare solo in presenza di *medium* fresco (Figura 7).

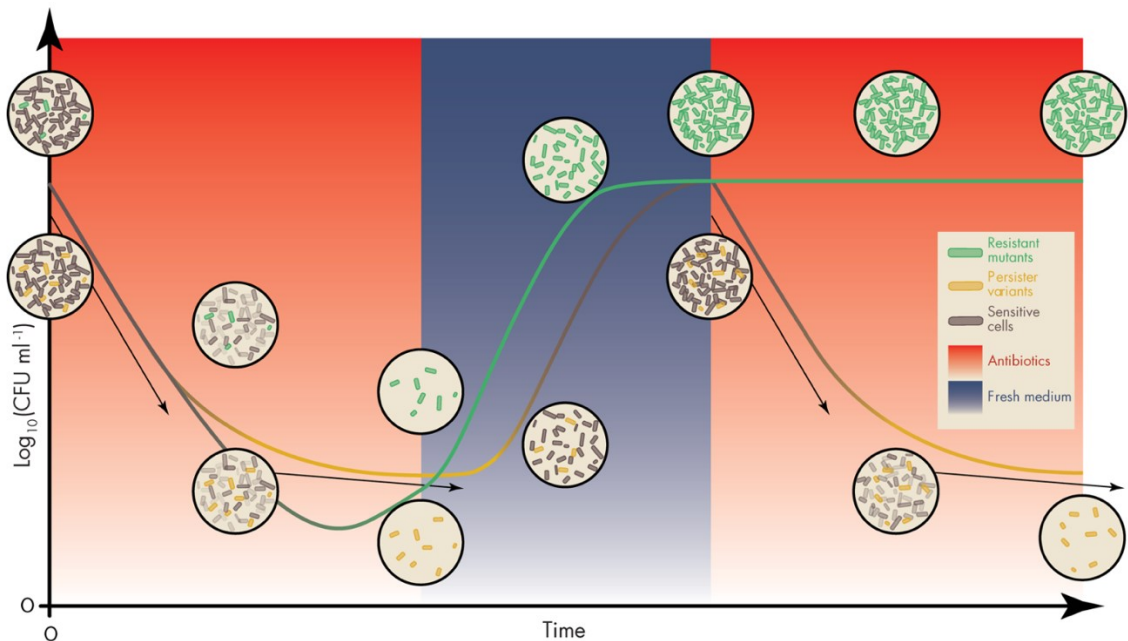


Figura 7 Curva che mostra la differenza tra persistenza e resistenza: i mutanti resistenti sono in grado di dividersi durante il trattamento a differenza dei persister. In seguito alla rimozione dell'antibiotico, entrambe ricominciano a dividersi anche se i persister hanno un ritardo maggiore (Van den Bergh et al., 2017).

La resistenza risulta essere ereditabile, essendo una modificazione genetica acquisita. Non è il caso della persistenza, in quanto caratteristica fenotipica che si manifesta solo in una frazione delle cellule presenti nella popolazione (Figura 8).

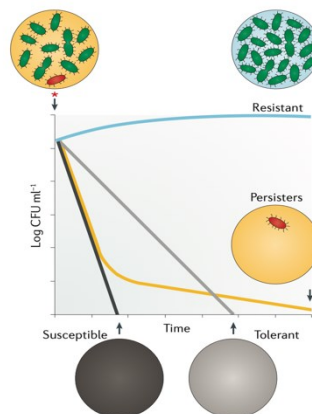


Figura 8 L'aggiunta di un antibiotico battericida (asterisco rosso) a una popolazione non resistente vede la formazione di una classica curva di uccisione bifasica (Fisher et al., 2017).

Un'ulteriore differenza con la persistenza è di tipo cronologico, in quanto la presenza della resistenza è riscontrabile già prima dell'applicazione clinica degli antibiotici. Inoltre, risulta essere inevitabile in quanto i suoi meccanismi hanno rapida diffusione in seguito all'introduzione di ogni nuovo antibiotico (Van den Bergh et al., 2017).

1.7.2. Meccanismi molecolari persistenza

I meccanismi molecolari associati alla persistenza risultano complessi e in molti casi non ancora del tutto conosciuti. I due principali processi che verranno analizzati nei prossimi capitoli sono: il sistema tossina-antitossina (TA) e la risposta stringente indotta dalla mancanza di nutrienti. Oltre a questo, un ruolo di sicura importanza lo svolge il biofilm che fornisce un aggiuntivo livello di protezione alle cellule batteriche.

Un ulteriore elemento da considerare è lo stato di dormienza in cui entrano i batteri durante la *Long-Term Stationary Phase*. Questo porta ad un rallentamento del metabolismo che si è visto essere collegato ad un aumento delle mutazioni in specifici geni che possono implicare una maggiore presenza di cellule persistenti (Arunasri et al., 2014).

Ad esempio, si è osservato come una mutazione al gene *hipA*, in particolare nell'allele *hipA7* (*High Persistence Gene A7*), implichi un aumento dei *persisters* (Maisonneuve & Gerdzes, 2014). Questo cambiamento è risultato in un aumento del livello di persistenza anche fino a 1000 volte: si può arrivare ad avere il 20% della popolazione persistente quando normalmente lo è solo lo 0,1% (Balaban et al., 2019).

1.7.2.1. Sistema tossina-antitossina (TA)

La persistenza viene spesso influenzata dal sistema TA (Toxin/Antitoxin). Questo è uno dei principali protagonisti ed è composto da un duo genico:

- tossina: solitamente una proteina stabile in grado di inibire funzioni cellulari;
- antitossina: una proteina o un RNA non codificante corrispondente alla tossina, si lega a quest'ultima per neutralizzarne l'effetto. Sono più labili della tossina (Lewis, 2005, Maisonneuve & Gerdzes, 2014).

Si è visto che il sistema TA è in grado di indurre la persistenza quando vi è un accumulo della tossina. Questo avviene in specifici eventi portando al rallentamento sia della trascrizione che della traduzione (Figura 9).

Questo sistema è coinvolto anche nella resistenza agli antibiotici, riuscendo a bloccare i loro bersagli (Deter et al., 2017, Lewis, 2005, Zou et al., 2022). Il sistema può essere categorizzato in otto sottotipi (*Type I-VIII*), questa suddivisione avviene in base alla natura dell'antitossina (RNA o proteina) e al modo in cui contrasta la tossina (inibendo la sintesi della tossina o l'attività della

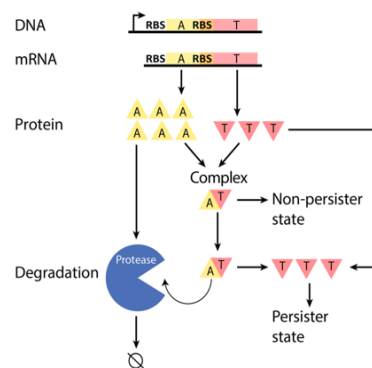


Figura 9 Schema del sistema TA, un aumento della tossina libera induce la formazione di *persisters*. (Deter et al., 2017).

tossina). I sistemi sono numerati in ordine di scoperta e presentano le seguenti caratteristiche (Figura 10):

- type I*: le sue antitossine sono piccoli RNA in grado di silenziare la trascrizione delle tossine reciproche;
- type II*: le antitossine formano un complesso neutralizzante;
- type III*: le sue antitossine sono piccoli *pseudoknot* RNA che sequestrano le tossine formando complessi proteina-RNA neutralizzanti;
- type IV*: proteine che agiscono sui bersagli cellulari delle tossine, proteggono il bersaglio piuttosto che bloccare la tossina stessa;
- type V*: sono RNasi che degradano l'mRNA che codifica le reciproche tossine;
- type VI*: le antitossine sono proteine che agiscono da adattatori andando a indirizzare le tossine verso una degradazione da parte di proteasi ATP-dipendenti;
- type VII*: le sue antitossine sono proteine che inattivano le tossine con modifiche post-traduzionali;
- type VIII*: RNA che reprimono l'espressione agendo sugli RNA che codificano le tossine. Possono svolgere un'azione di RNA antisense o andando a imitare un RNA CRISPR che recluta una proteina Cas, la quale agisce come repressore trascrizionale (Jurėnas et al., 2022).

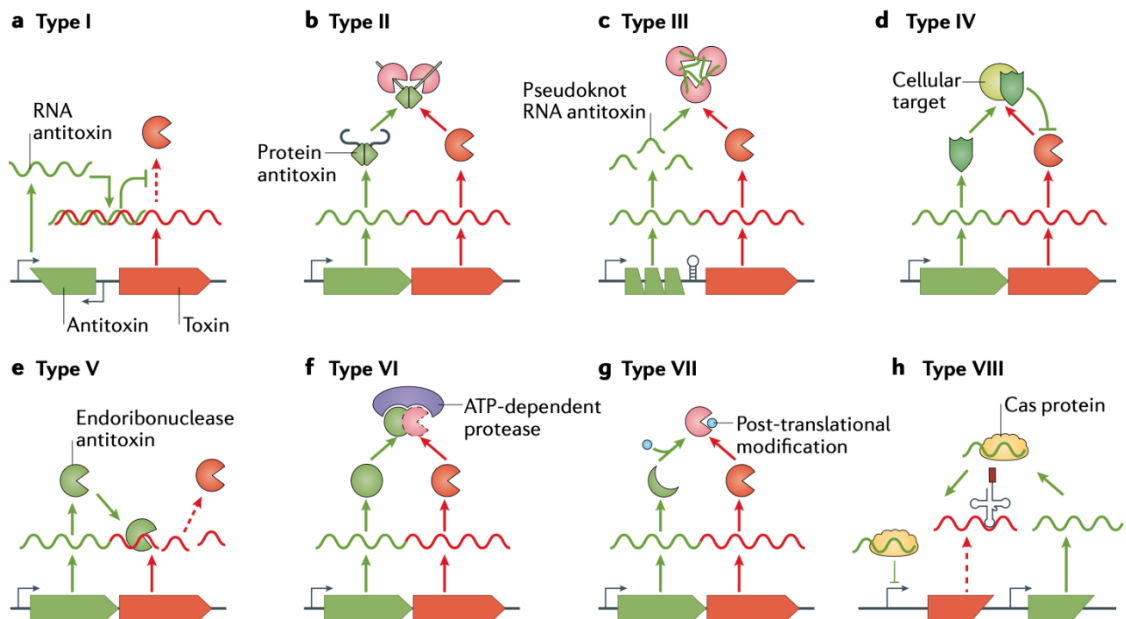


Figura 10 Rappresentazione schematica delle varie tipologie di sistemi TA (Jurėnas et al., 2022).

La presenza di diversi sistemi TA suggerisce un certo grado di ridondanza genetica, permettendo lo stesso funzionamento nel caso in cui uno dei sottotipi sia assente. Il sistema TA di tipo II è quello più diffuso e particolarmente legato alla persistenza (Van den Bergh et al., 2017, Page e Peti, 2016).

Nello specifico il funzionamento del sistema di tipo II vede come protagonisti: la tossina, la corrispondente antitossina e una proteasi chiamata Lon. Quest'ultima degrada più antitossina in quanto risulta molto più labile rispetto alla tossina: è necessaria una maggiore produzione di antitossina da parte del sistema.

L'antitossina per degradare la tossina deve formare un complesso con quest'ultima portando alla sua neutralizzazione.

Dal punto di vista della regolazione si ha l'antitossina e il complesso TA che vanno a reprimere l'operone TA: quando il livello di tossina è basso il complesso TA si lega alla regione promotrice e inibisce la trascrizione. La tossina, invece, svolge un meccanismo chiamato "conditional cooperativity": funziona sia da co-repressore sia da promotore della trascrizione (Figura 11) (Maisonneuve & Gerdes, 2014).

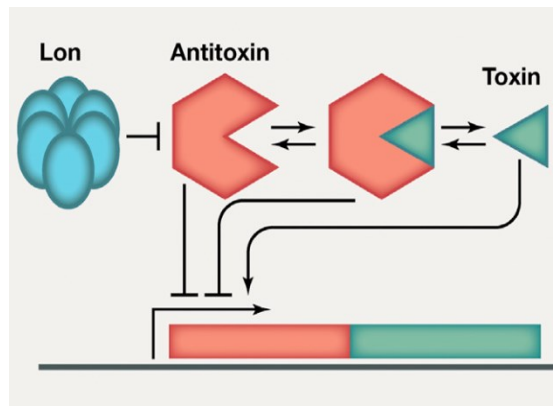


Figura 11 Schema che mostra il controllo trascrizionale di un sistema TA di tipo II canonico (Maisonneuve & Gerdes, 2014).

Da questo meccanismo è evidente come durante lo stato di persistenza, il rapporto tra tossina e antitossina sarà a favore della prima. Questo è dovuto a causa del rallentamento del metabolismo cellulare che implica un basso tasso di traduzione e dell'instabilità dell'antitossina, che sarà soggetta a degradazione proteolitica (non riuscirà a bloccare l'eccesso di attività tossica). Di conseguenza tutto questo meccanismo stimolerà una maggiore produzione di tossina visto che la trascrizione dell'operone TA sarà potenziata, andando così ad amplificare la produzione di tossina stessa all'interno dei *persisters*.

1.7.2.2. Risposta stringente da mancanza di nutrienti

L'(p)ppGpp, o guanosina pentaosfato/tetraosfato, è un piccolo metabolita prodotto dai batteri che funge da segnale di risposta allo stress cellulare. Questo composto è coinvolto nella "risposta stringente", che vede una regolazione cellulare quando il batterio è sottoposto a condizioni di stress, in particolare una carenza di nutrienti, ma anche elevate temperature o cambiamenti di pH (Travis & Schumacher, 2022).

La risposta stringente è ciò che porta il batterio in fase stazionaria permettendo la sopravvivenza. Vede una modifica dell'espressione di moltissimi geni, circa 500, che portano a cambiamenti drastici sia nel metabolismo sia nella trascrizione genica portando come risultato finale un rallentamento della crescita cellulare (Maisonneuve & Gerdes, 2014).

La formazione del (p)ppGpp vede una serie di reazioni enzimatiche all'interno delle cellule batteriche che hanno come principali enzimi due sintetasi (Figura 12):

- RelA: identificato per la prima volta in *E. Coli* e associato a mancanza di amminoacidi. Presenta due siti catalitici, uno per la sintesi e uno per l'idrolasi del (p)ppGpp, quest'ultimo non è funzionale;
- SpoT: attivato quando mancano altri nutrienti come ferro, fosforo o acidi grassi. A differenza di RelA presenta due siti catalitici entrambi funzionali, potendo svolgere un'azione sia di sintetasi che di idrolasi (Dalebroux e Swanson, 2012).

Questi enzimi, ampiamente presenti in diverse specie batteriche, sono presentati categorizzati in (Figura 13):

- multidominio: conosciuti come omologhi di RelA e SpoT (RSHs);
- singolo dominio: divisi in base alla loro azione di sintetasi (SASs) o di idrolasi (SAHs) (Anderson et al., 2021).

Un altro elemento importante all'interno del processo è il fattore di trascrizione DksA. Questa proteina aiuta a controllare l'attività della RNA polimerasi durante la risposta stringente, andando a influenzare quali geni vengono trascritti e contribuendo così all'adattamento della cellula alle nuove condizioni ambientali (Figura 12) (Dalebroux e Swanson, 2012).

In condizioni di crescita favorevole, la quantità di (p)ppGpp all'interno della cellula batterica è bassa. Questa aumenta in seguito all'esposizione a uno stress, come la mancanza di nutrienti o la presenza di antibiotici. In seguito all'aumento si ha: inibizione della trascrizione genica, rallentamento traduzione proteica, blocco della replicazione cellulare (Srivatsan & Wang, 2008; Van den Bergh et al., 2017). Il ruolo di questo sistema di protezione suggerisce un possibile legame con la formazione della persistenza. In particolare, si è visto come i mutanti privi dei geni chiave implicati nella risposta stringente (*dskA*, *relA* e *spoT*) vedano la presenza di meno *persisters* a causa di una minore produzione di (p)ppGpp. Il suo livello gioca, quindi, un ruolo critico nella persistenza batterica (Viducic et al., 2006).

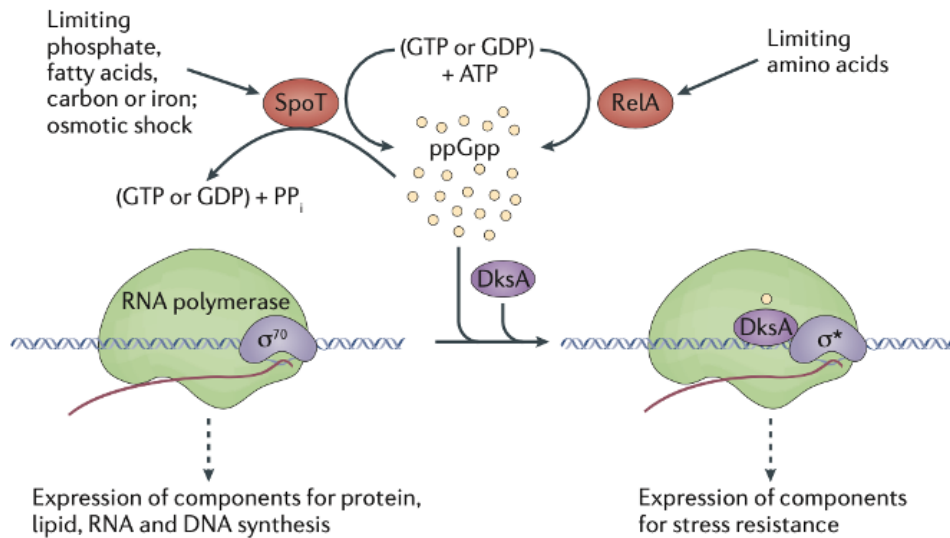


Figura 12 Funzionamento della regolazione indotta dalla risposta stringente (Dalebroux e Swanson, 2012).

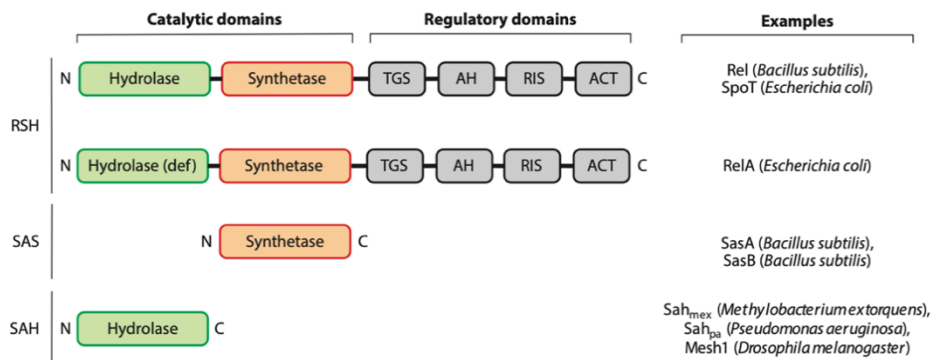


Figura 13 Esempi di RSHs, SASs, e SAHs (Anderson et al., 2021).

1.7.2.3. Interazione tra i due sistemi

La risposta stringente e il sistema TA sono tra loro correlati andando a formare un unico grande meccanismo che implica un aumento dei *persisters* nella popolazione (Figura 14). In particolare:

- Una maggior presenza di tossina stimola la produzione di una quantità più elevata di (p)ppGpp (Korch et al., 2003).
- Il (p)ppGpp è in grado di inibire l'attività della PPX, una fosfatasi responsabile della degradazione del polifosfato (PolyP). Quest'ultimo si occupa di attivare la proteasi Lon. Una minore attività della PPX implica una minor degradazione di PolyP, che può quindi attivare maggiormente la proteasi Lon, che degraderà più antitossina portando ad una maggiore quantità di tossina libera (Maisonneuve e Gerdes, 2014; Tian et al., 2016).

È evidente come i due meccanismi si potenziano l'uno con l'altro: nel primo caso un'elevata presenza di tossina va a stimolare la produzione di (p)ppGpp che a sua volta andrà a inibire PPX portando alla fine di tutto il processo ad aumentare la tossina presente, che di nuovo incrementerà la produzione di (p)ppGpp ricominciando il ciclo.

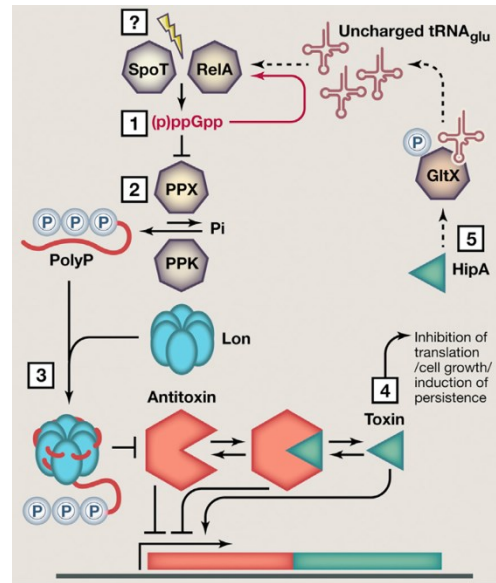


Figura 14 Schema dell'interazione tra il sistema TA e la risposta stringente (Maisonneuve & Gerdes, 2014).

1.7.3. Stato "Viable But Not Culturable" (VBNC)

In condizioni di stress, i batteri possono attuare un'ulteriore forma di dormienza chiamata "Viable But Not Culturable" (VBNC). Questa strategia di sopravvivenza è adottata da molti batteri in risposta a condizioni ambientali avverse, ci sono numerosi stress che una cellula in stato VBNC può superare come: mancanza di nutrienti, temperature e pH non ottimali, livelli bassi d'ossigeno.

Questo particolare stato è stato osservato per la prima volta nel 1982 all'interno di popolazioni di batteri *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae*. In questo caso si era visto come i batteri sospesi in una soluzione di acqua di mare artificiale manifestavano una rapida perdita della loro capacità di crescere su terreni di coltura tradizionalmente favorevoli, ma mantenevano una vitalità residua (Xu et al., 1982).

Nel dettaglio, le cellule che si trovano in uno stato VBNC rappresentano una sottopopolazione batterica che ha temporaneamente perso la capacità di proliferare su terreni comunemente impiegati in laboratorio, su cui precedentemente era in grado di svilupparsi. Quando le condizioni ambientali tornano a essere idonee, le cellule VBNC diventano nuovamente coltivabili.

Tuttavia, spesso non è semplice individuare il trattamento specifico che consenta tale ritorno alla normalità (İzgördü et al., 2022, Ayrapetyan et al., 2018).

In generale queste cellule presentano un'attività metabolica ridotta, conservano l'integrità della membrana cellulare e continuano a sintetizzare proteine (Ayrapetyan et al., 2018).

È stato documentato che oltre 100 specie di microrganismi, tra cui batteri e funghi, possono entrare nello stato VBNC in risposta a vari fattori di stress ambientale, tra queste è compresa anche *Pseudomonas fluorescens*.

1.7.4. Biofilm

Il biofilm è una struttura che garantisce una maggiore resistenza contro trattamenti antibiotici o altre forme di stress creando una matrice compatta che mantiene unita la comunità batterica. (Thi et al., 2020).

I meccanismi molecolari che orchestrano la formazione dei biofilm possono essere molto diversi tra le specie batteriche e persino tra differenti ceppi della stessa specie. Tuttavia, alcune caratteristiche sono universalmente riconosciute come tratti comuni nella genesi dei biofilm. Ad esempio, tutti i biofilm condividono la presenza di una matrice extracellulare che funge da collante tra le cellule. Questa matrice spesso consiste in un biopolimero polisaccaridico associato ad altre componenti quali proteine o DNA. La composizione dell'esopolisaccaride varia ampiamente a seconda delle condizioni di crescita, del substrato e dell'ambiente circostante (López et al., 2010).

Questa matrice fornisce un supporto per l'adesione a substrati di vario tipo rappresentando un enorme problema nell'industria alimentare. In particolare, la pulizia e la disinfezione delle superfici e dei macchinari coinvolti può risultare molto complessa, poiché le strutture protettive del biofilm possono resistere agli agenti di pulizia tradizionali. Nel caso di *Pseudomonas fluorescens* è in grado di creare un ambiente adatto alla crescita di microrganismi patogeni, potenzialmente rischiosi per i consumatori, oltre che innescare il processo di corrosione degli impianti (Kumar et al., 2019).

Per ciò che riguarda la formazione del biofilm in *Pseudomonas aeruginosa*, tre esopolisaccaridi rivestono un ruolo chiave ai quali si aggiunge il DNA extracellulare (eDNA):

- PSL: polimero ricco di mannosio con funzione cruciale nell'adesione. Questa sostanza si accumula alla periferia della struttura, contribuendo alla sua stabilità. Stimola inoltre la produzione di c-di-GMP, che favorisce la creazione di un biofilm più spesso e robusto;
- PEL: polimero ricco di glucosio, essenziale per l'adesione iniziale alla superficie;
- alginato: con varie funzioni tra cui la maturazione del biofilm e la protezione dalla fagocitosi e dall'opsonizzazione;
- eDNA: nutriente, contribuisce all'organizzazione cellulare, lega ioni Mg^{2+} e Ca^{2+} , stimola la secrezione di fattori di virulenza (López et al., 2010).

La sua formazione coinvolge diversi *step* che si verificano sequenzialmente nel tempo (Figura 15):

- adesione: fase iniziale in cui le cellule batteriche si attaccano alle superfici attraverso interazioni fisiche e chimiche. I primi colonizzatori forniscono un substrato per l'adesione di cellule successive;
- aggregazione e maturazione precoce: le cellule aderenti iniziano ad aggregarsi formando piccoli gruppi. La produzione di una matrice extracellulare inizia a cementare le cellule insieme, creando una struttura tridimensionale in crescita;
- formazione matrice extracellulare: le cellule secernono polimeri extracellulari che compongono la matrice del biofilm;
- maturazione: la struttura diventa più compatta e tridimensionale, la matrice extracellulare diventa più densa, intrappolando nutrienti e sostanze chimiche;
- dispersione e sviluppo di nuovi biofilm: in alcuni casi le cellule possono staccarsi e diffondersi in altre aree per formare nuovi biofilm (Aiyer et al., 2018).

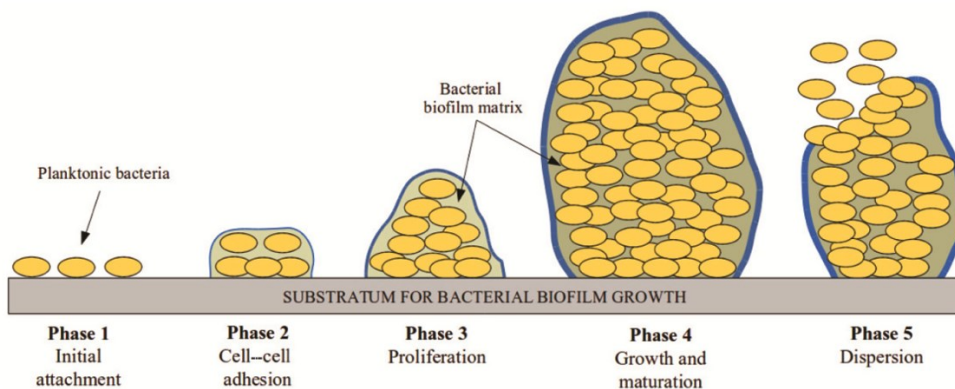


Figura 15 Fasi formazione biofilm (Aiyer et al., 2018).

Il biofilm è, inoltre, collegato alla risposta stringente in quanto lo stesso (p)ppGpp è implicato nella sua formazione (Sugisaki et al., 2013).

1.7.5. Quorum sensing

Il *quorum sensing* è un processo di comunicazione chimica tra cellule batteriche. Permette ai batteri di modificare in modo sincrono il loro comportamento, rispondendo in modo più efficace ai cambiamenti che avvengono nell'ambiente stesso (Mukherjee & Bassler, 2019).

L'accumulo degli *autoinducers* prodotti dai batteri porta ad un aumento dei loro livelli extracellulari: la concentrazione degli *autoinducers* può essere correlata alla densità della popolazione stessa. Ad alte concentrazioni possono andare ad innescare delle cascate di trasduzione del segnale, le quali portano a varie risposte multicellulari nella popolazione batterica. Con questo sistema vengono controllati un gran numero di processi come la produzione di pigmenti o formazione del biofilm (Camilli & Bassler, 2006).

2. Obiettivi

Pseudomonas fluorescens è uno dei principali alteranti per l'industria alimentare: la sua capacità di crescere in condizioni molto differenti, anche avverse, essendo di fatto ubiquitario lo rende protagonista dello *spoilage* di alimenti di varie categorie. Inoltre, essendo in grado di crescere alle temperature di refrigerazione può contaminare anche quegli alimenti che vengono conservati a basse temperature. Insieme a queste caratteristiche è anche in grado di costituire forme di resistenza che gli permettono di superare condizioni di stress, prima tra tutte la mancanza di nutrimenti, condizione molto frequente nella filiera produttiva.

Per tutti questi motivi, controllare la sua crescita e prevenire la sua contaminazione è fondamentale per garantire la sicurezza e la qualità all'interno dell'industria alimentare.

Questa tesi si pone come scopo quello di approfondire i meccanismi associati alla persistenza di *Pseudomonas*. Nello specifico sono stati seguiti 3 diversi ceppi di *Pseudomonas fluorescens*, ciascuno con 5 repliche utilizzando colture a lungo termine (3 mesi) in terreno minimo. Le colture sono state incubate sia a 22 °C, cioè la temperatura considerata ottimale per la crescita di questo batterio, sia a 4 °C cioè la temperatura di refrigerazione.

In particolare, durante le colture a lungo termine si è valutato se con il passare del tempo si modificava la crescita batterica, la capacità di formare di biofilm, la motilità, la frazione di *persisters* e di VBNC con l'incubazione alle due temperature.

3. Materiali e metodi

3.1. Ceppi batterici

Durante l'esperimento sono stati utilizzati 3 ceppi batterici differenti. Tutti 3 i ceppi impiegati sono *Pseudomonas fluorescens* gruppo *fluorescens*, in particolare:

- ceppo L3_4: *P. fluorescens* subgroup, ceppo isolato dal latte UHT in Italia;
- ceppo uk1: *P. fluorescens* subgroup, ceppo isolato da carne blu in Inghilterra;
- ceppo CECT 378 T: ceppo di riferimento, *P. fluorescens* subgroup.

3.2. Preparazione delle *long term cultures*

Per l'esecuzione dell'esperimento sono stati preparati, al tempo zero, 5 tubi falcon da 50 ml per ogni ceppo considerato nel capitolo precedente, quindi cinque repliche per ciascuna coltura (totale: 15 tubi).

Queste sono le "long term cultures" che verranno seguite nel tempo. I passaggi per ottenerle, uguali per tutti e 3 ceppi, sono stati i seguenti (Figura 16):

- prelevare con un'ansata da piastra di *Pseudomonas* Agar Base (PAB) addizionato con CFC (Cetrimide, Acido Fusidico, Cefalosporina) una colonia pura precedentemente controllata;
- porre la colonia prelevata in una falcon contenente 3 ml di Tryptone Soy Broth + Yeast Extract (TSB+YE);
- verificare che la densità ottica a OD₆₀₀ sia circa 0,35. Da prove preliminari precedenti si è visto che a questo valore sono presenti 10⁸ cell/ml;
- eseguire diluzioni seriali in TSB fino a 10³;
- suddividere la diluzione appena ottenuta in 5 tubi falcon: 1 ml di coltura batterica + 39 ml di TBS+YE;
- incubare per 22 ore a 22°C le falcon ottenute;
- centrifugare le falcon a 3500 rpm per 15 minuti;
- eliminare il surnatante ed aggiungere 30 ml di PBS;
- centrifugare le falcon a 3500 rpm per 15 minuti;
- eliminare il surnatante;
- aggiungere 40 ml di Minimal Bacterial Medium (MBM).

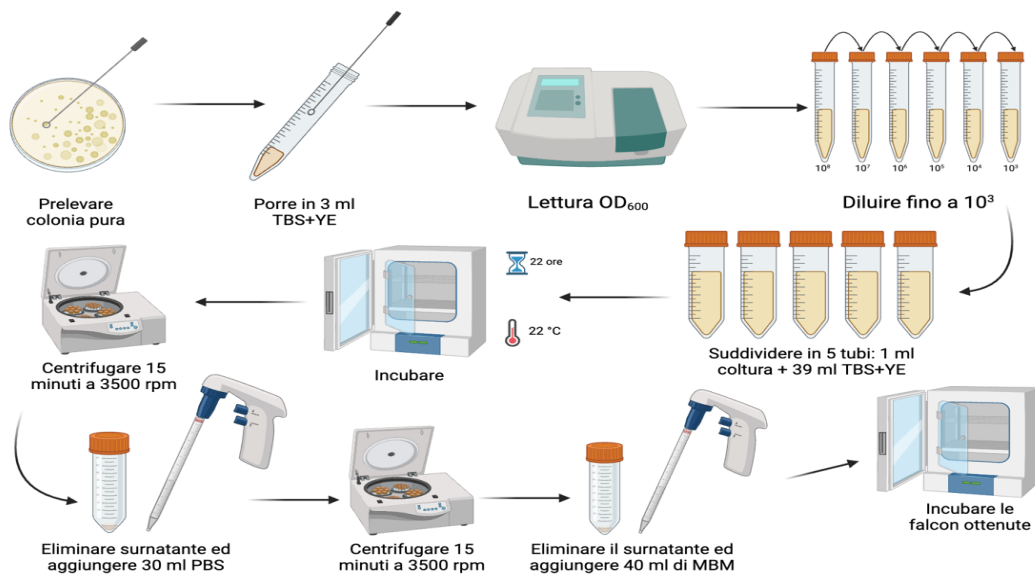


Figura 16 Preparazione dei tubi (immagine realizzata con BioRender.com).

Il procedimento per ottenere le *long term cultures* per i due esperimenti è stato lo stesso, con la differenza nella modalità di conservazione: 4 °C per l'esperimento a 4°C e 22 °C per l'esperimento a 22 °C.

3.3.Schema dell'esperimento

In seguito alla preparazione delle colture l'esperimento è stato monitorato con cadenza mensile: tempo zero, 30 giorni, 60 giorni, 90 giorni, 120 giorni, 180 giorni. Per ognuno di questi tempi sono state prelevate delle aliquote dai tubi che sono state suddivise nel seguente modo (Figura 17):

- 100 µl per le diluzioni seriali e le successive conte;
- 200 µl per la lettura allo spettrofotometro con OD₆₀₀;
- 200 µl che hanno visto trattamento con PMAxx ed in seguito real time PCR;
- 250 µl per il RNA. Questo passaggio ha visto la centrifugazione per 5 minuti a 10.000 rpm ed in seguito alla eliminazione del surnatante l'aggiunta di 250 µl di RNA *later* e la conservazione a -80 °C.
- 1 ml al quale viene aggiunto 0,25 ml di glicerolo ed in seguito a passaggio su vortex viene conservato a -80 °C;
- 100 µl per il trattamento con la kanamicina;
- 3 µl per ogni semina per la motilità;
- 2 µl per ogni pozzetto della piastra per valutare il biofilm.

L'esperienza si è svolta in egual modo per l'esperienza a 4°C e a 22°C con l'unica differenza nei tempi di incubazione: una settimana a 4°C per la prima e 24 ore a 22 °C per la seconda.

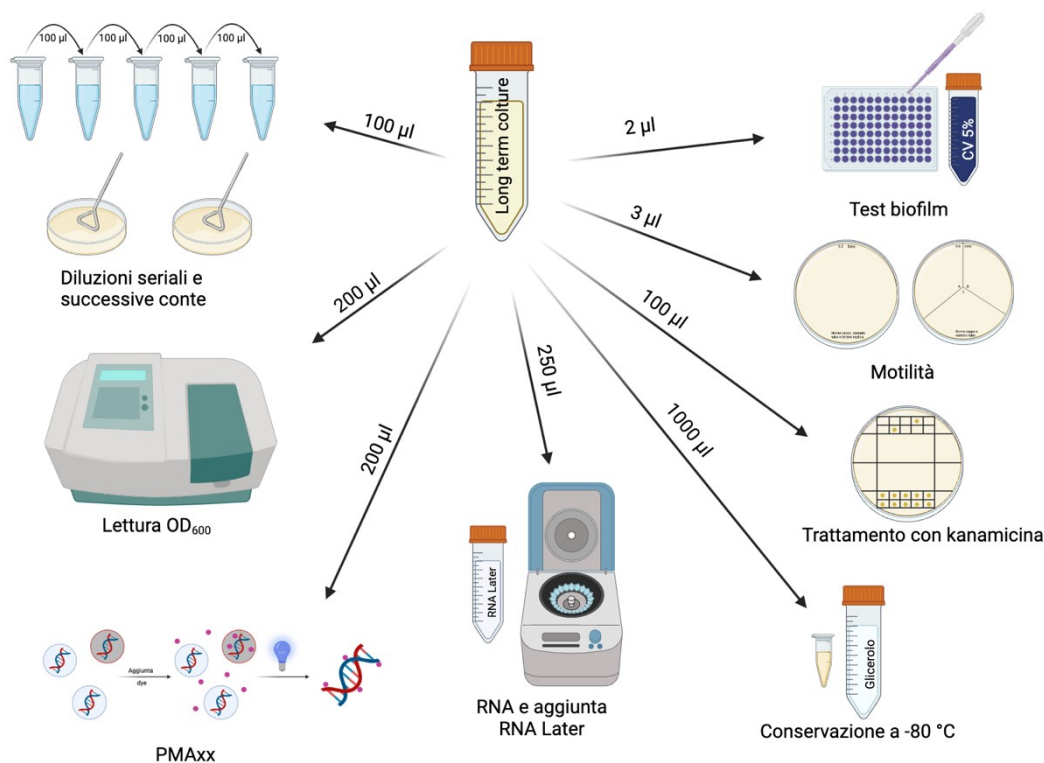


Figura 17 Schema svolgimento esperimento (immagine realizzata con BioRender.com).

3.4. Generazione curve di crescita

Per generare le curve di crescita è stata eseguita la conta batterica delle varie colture nei vari tempi riportati nel paragrafo precedente.

Sono state svolte delle diluzioni seriali in MBM fino alle concentrazioni valutate di volta in volta in base ai precedenti risultati. Le diluzioni desiderate ottenute sono state seminate mediante spatolamento in piastra contenente terreno PAB/CFC: in particolare, su ogni piastra sono state distribuiti 100 µl di coltura batterica che è poi stata piastrata sulla superficie mediante l'uso di anse sterili. In seguito, le piastre seminate sono state poste in incubatore con le tempistiche e le incubatore indicate in precedenza (Figura 18).

La concentrazione batterica è stata calcolata con la seguente formula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ colonie dil. 1} + N^{\circ} \text{ colonie dil. 2}}{\text{Volume inoculo} * (N^{\circ} \text{ piastre dil. 1} + 0,1 * N^{\circ} \text{ piastre dil. 2}) * \text{dil. 1}}$$

con il volume dell'inoculo pari a 100 µl e la diluzione 1 quella a concentrazione maggiore delle due diluizioni consecutive considerate.

I dati ottenuti sono stati elaborati in Excel e le curve prodotte sono visibili nel paragrafo risultati.

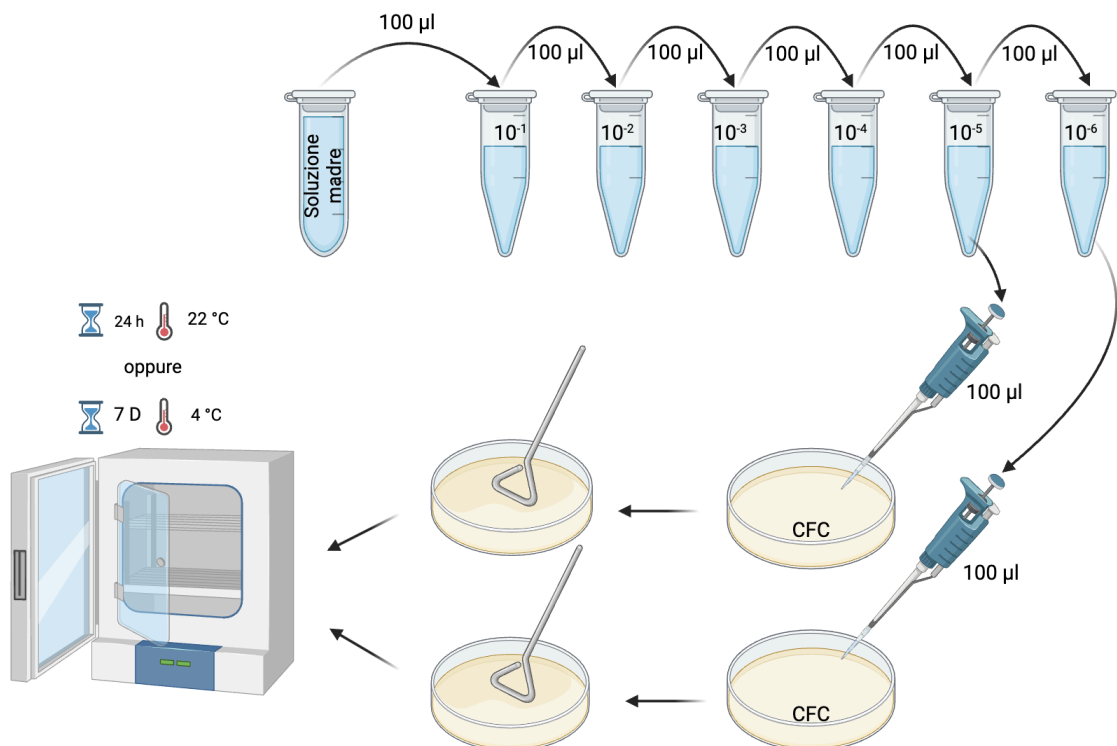


Figura 18 Rappresentazione schematica diluzioni seriali (immagine realizzata con BioRender.com).

3.5. Lettura allo spettrofotometro

La lettura allo spettrofotometro ha visto l'analisi di 200 µl di coltura con OD₆₀₀. In particolare, è stata eseguita una singola lettura per ogni tubo di coltura madre al fine di avere 5 misurazioni per ogni ceppo. È stata svolta, anche, la lettura dei pozzetti con all'interno 200 µl di MBM al fine di ottenere dei valori di bianco, dai quali si è calcolato il valore medio con la seguente formula:

$$Bianco_{medio} = \frac{Bianco\ 1 + Bianco\ 2 + Bianco\ 3}{3}$$

Successivamente, il valore di bianco medio è stato sottratto dai valori ottenuti dalle misurazioni ed in seguito si è calcolata la media di questi valori. Per esempio, nel caso di CECT 378 la formula utilizzata è stata:

$$OD\ CECT\ 378_{medio} = \frac{CECT\ 1 + CECT\ 2 + CECT\ 3 + CECT\ 4 + CECT\ 5}{5}$$

A ciascun valore ottenuto è stato, inoltre, associato un errore calcolando la deviazione standard rispetto alla media.

3.6. Test del biofilm

Questo test è stato eseguito per vedere la capacità dei vari ceppi di produrre biofilm, elemento associato alla persistenza. In particolare, per svolgere il test del biofilm è stato eseguito il seguente protocollo (Figura 19):

- una piastra di polistirene da 96 pozzetti viene caricata con 198 µl di MBM;
- la piastra viene caricata con 2 µl di coltura batterica. Per ogni tubo di coltura sono state svolte 5 repliche secondo lo schema riportato in Figura 20;
- incubazione a 22°C per 24 ore per l'esperimento a 22°C e a 4 °C per 7 giorni per l'esperimento a 4°C;
- prelievo del liquido (cellule planctoniche) e lettura allo spettrofotometro OD₆₀₀;
- lavaggio dei pozzetti 3 volte con NaCl allo 0.9%;
- asciugatura della piastra a 50°C per 40 min;
- colorazione con crystal-violetto al 5%;
- incubazione 15 min a temperature ambiente;
- lavaggio dei pozzetti con 200 µl di acqua deionizzata per 3 volte;
- asciugatura a temperatura ambiente, mettere la piastra sotto cappa per velocizzare il processo;
- aggiunta di 200 µl di etanolo 95% ghiacciato per solubilizzare il colorante;
- trasferimento dei pozzetti in una piastra adatta alla lettura allo spettrofotometro e lettura a OD₅₇₀.

In seguito, è avvenuta l'elaborazione dei dati grezzi per ottenere i dati effettivi finali. È stato inizialmente calcolato il valore medio dei bianchi ottenuti usando la seguente formula:

$$Bianco_{medio} = \frac{Bianco\ 1 + Bianco\ 2 + \dots + Bianco\ 15 + Bianco\ 16}{16}$$

Il valore così ottenuto è stato sottratto a tutti i valori di assorbanza misurati, sia per le cellule adese sia per quelle planctoniche. A questo punto si è normalizzato il dato ottenuto con la seguente formula:

$$\text{Fattore di biofilm} = \frac{OD_{\text{biofilm}}}{OD_{\text{planctoniche}}}$$

Il dato risultante fornisce un'approssimazione della quantità di materiale di biofilm generato dalle cellule. Successivamente è stata calcolata la media dei fattori di biofilm ottenuti dalle 5 repliche in modo da ottenere 5 valori finali per ogni ceppo, per i quali è stata calcolata un'ulteriore media avendo così un unico dato finale per ogni ceppo. In seguito, è stata svolta un'analisi statistica utilizzando Kruskal-Wallis rank sum test all'interno del software R-studio 2021.09.1.

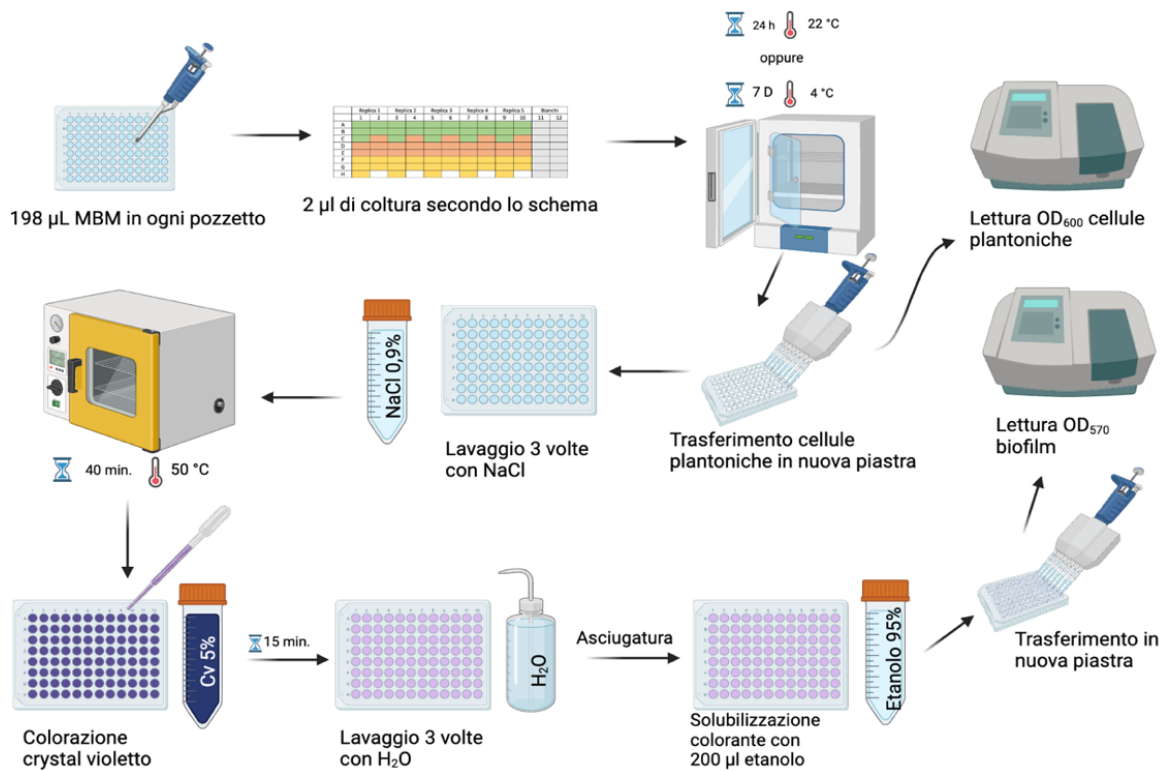


Figura 19 Rappresentazione schematica protocollo biofilm (immagine realizzata con BioRender.com).

	Replica 1		Replica 2		Replica 3		Replica 4		Replica 5		Bianchi	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Leggenda
CECT 378
L_34
UK1
Bianchi

Figura 20 Schema utilizzato per la piastra del utilizzata durante il biofilm con relativa leggenda.

3.7.Motilità

Il test di motilità batterica è un esperimento utilizzato per valutare la capacità dei batteri di muoversi o spostarsi in una determinata direzione. Questo test è particolarmente rilevante per identificare batteri che sono in grado di muoversi attraverso il mezzo di coltura in cui sono collocati.

Una quantità specifica di coltura batterica viene collocata su una piastra di Petri contenente un mezzo di coltura semisolido. Se i batteri sono mobili, cioè hanno la capacità di muoversi attraverso l'ambiente circostante, saranno in grado di diffondersi radialmente dal punto di inoculo. Questo spostamento può essere osservato visivamente nel corso del tempo.

In questo esperimento sono stati svolti 2 test differenti:

- swimming*: 3 μ l di coltura in terreno Tryptic Soy Agar (TSA) con 0.3% di agar. Si è svolta una semina andando a inserire il puntale all'interno del terreno di coltura. In ogni piastra di Petri è stato seminato un singolo campione, sono state svolte 3 repliche (A, B, C) per ogni tubo per un totale di 45 piastre (Figura 22);

- swarming*: 3 μ l di coltura in terreno TSA con 0.6% di agar. Si è svolta la semina andando a rilasciare una goccia di coltura sulla superficie della piastra. Le piastre di Petri sono state divise in 3 quadranti; si è seminato, nella stessa piastra le 3 repliche di ogni tubo (A, B, C), ottenendo così in totale 15 piastre (Figura 21).

In seguito alla semina si è atteso un tempo di incubazione di 24 ore a 22° C per l'esperimento a 22 °C e di 7 giorni a 4 °C per l'esperimento dei 4 °C. Successivamente le piastre sono state fotografate per mezzo di BioRad GelDock XR e le immagini ottenute analizzate con il software ImageJ. Qui è stata calcolata l'area prodotta dalle varie colonie ed è stata svolta un'analisi statistica utilizzando Kruskal-Wallis rank sum test all'interno del software R-studio 2021.09.1.

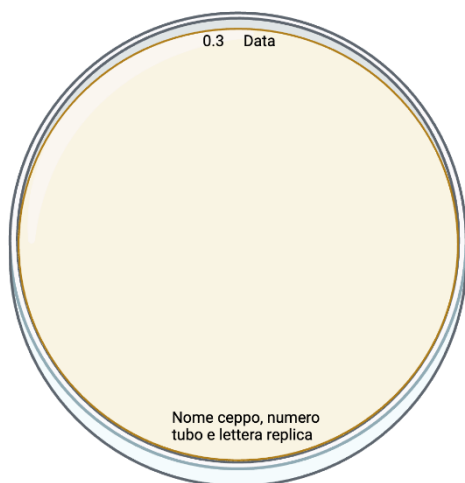


Figura 22 Rappresentazione piastra TSA usata per swimming (immagine realizzata con BioRender.com).



Figura 21 Rappresentazione piastra TSA usata per swarming (immagine realizzata con BioRender.com).

3.8. Identificazione dei *persisters*

Il trattamento con antibiotico permette di evidenziare la presenza di *persisters* oltre che distinguere queste cellule da quelle resistenti. L'antibiotico utilizzato per l'esperimento è stato la kanamicina, per la quale si è verificata prima la sensibilità, a concentrazione di 30 µg/µl per CECT 378 e di 6,25 µg/µl per L_34 e uk1. Il protocollo utilizzato prevedeva (Figura 23):

- unire 100 µl di coltura batterica a 100 µl di kanamicina (con concentrazioni indicate in precedenza) in una eppendorf;
- incubare l'eppendorf *overnight* (a 4 °C o 22 °C);
- lavare due volte con PBS e piastrare le colture in terreno PAB/CFC.

Solo le cellule persistenti o resistenti possono crescere in seguito al trattamento. Successivamente l'esperimento si divide in due procedimenti diversi. Il primo vede:

- scegliere 10 colonie che andranno inserite in una piastra da 96 pozzetti, in particolare verranno poste secondo lo schema riportato in Figura 24;
- prelevare da ogni pozzetto 3 µl e rilasciarli sulla piastra precedentemente suddivisa come si può vedere nello schema dell'esperimento;
- valutare la crescita in seguito ad un'incubazione (4 °C per 7 giorni o 22 °C *overnight*): le colonie che crescono solo nel controllo sono persistenti mentre quelle che crescono in entrambi gli spot sono resistenti;
- dissolvere una parte delle colonie e conservare a -20 °C aggiungendo 100 µl di acqua DNA *free*.

Il secondo procedimento prevede il lavaggio della piastra da cui prima sono state prelevate le colonie con MBM. Successivamente si divide l'ottenuto in 3 parti:

- 300 µl vengono mischiati con del glicerolo e conservati a -80 °C;
- 300 µl come controllo;
- 300 µl a cui vengono aggiunti 300 µl di antibiotico.

Il secondo e il terzo campione, rispettivamente controllo e quello con aggiunta di antibiotico, vengono incubati *overnight* (a 4 °C o a 22 °C) e successivamente si piastrano in piastra PAB/CFC. Se le colonie appaiono in seguito al trattamento sono resistenti se invece sono presenti solo sul controllo sono persistenti.

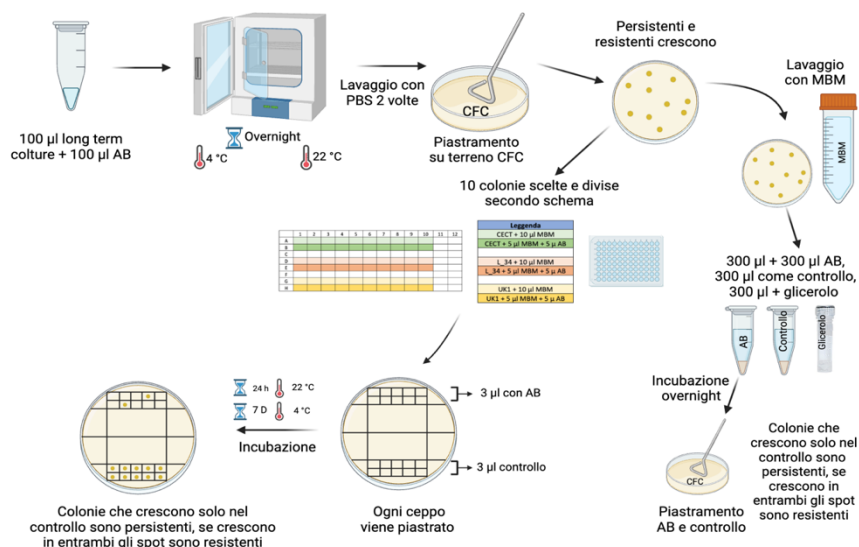


Figura 23 Rappresentazione del trattamento con antibiotico (immagine realizzata con BioRender.com).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Leggenda
CECT + 10 µl MBM
CECT + 5 µl MBM + 5 µ AB
L_34 + 10 µl MBM
L_34 + 5 µl MBM + 5 µ AB
UK1 + 10 µl MBM
UK1 + 5 µl MBM + 5 µ AB

Figura 24 Schema utilizzato durante il protocollo di trattamento con antibiotico con relativa leggenda.

3.9. Utilizzo colorante PMAxx: amplificazione selettiva cellule vitali

I coloranti come il PMAxx permettono di amplificare in PCR solo DNA che deriva da cellule vitali. In particolare, questi coloranti riescono a penetrare solo nelle cellule morte dove all'interno possono legarsi al DNA, in quanto la membrana delle cellule vive è impermeabile al loro passaggio. In seguito all'azione del colorante si esegue un'esposizione con una luce intensa che rende i coloranti reattivi e li fa legare covalentemente al DNA. Questo legame impedisce l'amplificazione nelle successive reazioni di PCR (Figura 25)

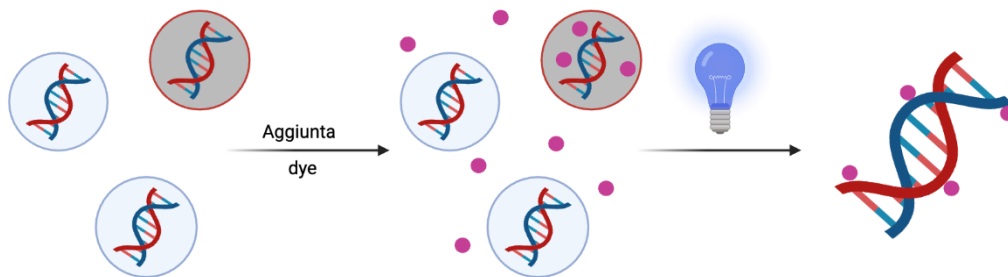


Figura 25 Rappresentazione del funzionamento PMAxx (immagine realizzata con BioRender.com).

I passaggi che sono stati applicati hanno visto:

- aggiungere all'eppendorf con 200 µl di coltura batterica 50µl di *enhancer* 5X e 2,5 µl di PMAxx 2,5 nM;
- mescolare le eppendorf tenendole al riparo dalla luce;
- attendere 10 minuti;
- eseguire un ciclo di 15 minuti su PMA-Lite™ LED photolysis Device;
- stoccare le eppendorf a -20 °C.

3.10. Estrazione DNA batterico

Il DNA batterico è stato estratto mediante bollitura. Il protocollo usato prevede i seguenti passaggi:

- 2 minuti di centrifuga a 10000 rpm;
- eliminare il surnatante
- aggiungere 100 µl di acqua *nuclease-free* e mischiare con vortex;
- estrazione del DNA a 95 °C per 10 minuti;
- 2 minuti di centrifuga a 12000 rpm;
- prelevare il surnatante e conservare a -20 °C.

3.11. Real time PCR

Per valutare la dinamica di crescita della coltura batterica, è stata condotta un'analisi di real-time PCR (Reazione a Catena della Polimerasi) utilizzando il sistema LightCycler® 480, Roche. Sono stati impiegati specifici *primer* progettati per il gene *rpoD* di *Pseudomonas* visibili nella Tabella 1.

Primer utilizzati	
Forward	AGCTCAACCGTATTTCCCG (19)
Reverse	TTCGATGAAGTCACCCAGATG (21)

Tabella 1 Primer utilizzati per la real time PCR.

Il DNA estratto dalle cellule batteriche è stato diluito 1:100 prima di essere aggiunto alla mix di reazione. Quest'ultima è stata preparata con la *Master mix PowerUpSYBR Green (Applied Biosystems™)*. Al suo interno è presente il SYBR Green, un fluoroforo che è in grado di intercalarsi in modo aspecifico nel DNA, permettendo di valutare la presenza di DNA a doppio elica amplificato dalla reazione. Oltre a questo componente è presente: dNTPs, enzima Taq polimerasi, soluzione tampone di reazione, ioni MgCl₂.

Il totale dei volumi utilizzati è riportato nella Tabella 2.

Mixer real time PCR	
Componente	Volume
MasterMix	5 µl
Primer FW (10µM)	0,25 µl
Primer RW (10µM)	0,25 µl
DNA	2,5 µl
Acqua	2 µl

Tabella 2 Componenti mix real time PCR, il volume totale è di 10 µl.

Il protocollo utilizzato ha visto 45 cicli di reazione i cui tempi e temperature sono visibili in Tabella 3. È stato utilizzato il sistema UDG al fine di prevenire la contaminazione di DNA con uracile non desiderato, in quanto anche una quantità minima di DNA estraneo può influire in modo negativo sulla reazione.

Per affrontare questa problematica, è stato eseguito uno stadio iniziale in cui si utilizzano desossiridinotri-fosfati (dUTP) e l'enzima uracil-DNA-glicosilasi (UDG). Durante questa fase, eventuali frammenti contaminanti incorporano uracile al posto della timina nel DNA, consentendo così la loro successiva degradazione da parte dell'UDG. Questo sistema consente l'eliminazione dei contaminanti senza alcun impatto sul DNA bersaglio contenente timina. Inoltre, l'UDG viene successivamente inattivato tramite un ciclo a 50°C per 2 minuti (Longo et al., 1990). Questo approccio garantisce la riduzione delle possibilità di falsi positivi nella qPCR e migliora la specificità dell'analisi.

Protocollo con tempi e temperature real time PCR		
Step	Temperatura	Tempo
Sistema UDG	50 °C	2 minuti
Denaturazione iniziale	95 °C	2 minuti
Denaturazione	95 °C	10 secondi
Annealing ed estensione	60 °C	40 secondi
Creazione curva di melting	95 °C	5 secondi
	60 °C	1 minuto
	95 °C	0,11 °C/s
Raffreddamento	40 °C	30 secondi
Mantenimento	4 °C	-

45
cicli

Tabella 3 Protocollo eseguito per la real time PCR.

3.12. Soluzioni e terreni

Pseudomonas Agar Base (PAB) addizionato con CFC (Cetrimide, Acido Fusidico, Cefalosporina)	
Composto	g/l (in ddH ₂ O)
Gelatin peptone	16
Agar	11
Idrolisato di caseina	10
Solfato di potassio	10
Cloruro di magnesio	1,4
Cefalosporina	0,05
Acido fusidico	0,01
Cetrimide	0,01

Tabella 4 Composizione terreno PAB/CFC.

Minimal Bacterial Medium (MBM)	
Composto	g/l (in ddH ₂ O)
K ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	3
Glucosio	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O	0,5
MgSO ₄ eptaidrato	0,1

Tabella 5 Composizione MBM.

Tryptone Soy Broth + Yeast Extract (TSB+YE)	
Composto	g/l (in ddH ₂ O)
Tryptone	17
Estratto di lievito	6
NaCl	5
Peptone di soia	3
Destrosio	2.5
Fosfato d'idrogeno dipotassico	2.5

Tabella 6 Composizione TSB+YE.

Tryptic Soy Agar (TSA)	
Composto	g/l (in ddH ₂ O)
Tryptone	17
Agar	3 o 6
NaCl	5
Peptone di soia	3
Destrosio	2.5
Fosfato d'idrogeno dipotassico	2.5

Tabella 7 Composizione terreno TSA.

4. Risultati

Al fine di studiare la persistenza di *Pseudomonas fluorescens* in condizioni di stress, in questo caso un ambiente con carenza di nutrienti, sono state avviate ed osservate delle *long-term cultures*.

Per avviare queste colture è stato inoculato, come descritto nel paragrafo 3.2 in materiali e metodi, una quantità iniziale di circa 10^8 cell/ml, che in seguito ad un primo passaggio in terreno TSB+YE ha visto l'avvio delle *long-term cultures*.

In seguito a questo passaggio è stata eseguita una periodica valutazione delle colture per la conta cellulare, la produzione di biofilm, la motilità. Nei prossimi paragrafi sono riportati i risultati ottenuti, suddivisi tra le varie procedure utilizzate. Durante l'esperimento sono stati considerati 3 ceppi differenti di *Pseudomonas fluorescens*: un ceppo di riferimento CECT 378 e due ceppi isolati da alimenti L3_4 e uk1 (quest'ultimo produttore di pigmento nero).

4.1. Determinazione delle curve di crescita

In seguito all'inoculo iniziale è stato svolto un monitoraggio della crescita batterica mediante: conta cellulare su piastra, lettura allo spettrofotometro, real time PCR quantitativa.

Per la conta su piastra, come descritto in materiali e metodi nel paragrafo 3.4, è stato utilizzato il terreno selettivo PAB/CFC su cui si è svolta la semina mediante spatolamento. Successivamente al tempo di incubazione, 4 °C per 7 giorni per l'esperimento a 4 °C e 22 °C per un giorno per quello a 22 °C, è stata effettuata una conta delle colonie. I risultati ottenuti sono stati riportati su file Excel ed in seguito all'elaborazione dei dati è stato calcolato il logaritmo in base 10 del valore ottenuto al fine di avere una migliore rappresentazione nei grafici. In particolare, le diluizioni piastrate ed utilizzate nella conta sono state differenti a seconda dei precedenti risultati ottenuti al fine di avere sempre i migliori valori.

La lettura allo spettrofotometro è stata svolta con OD600. In seguito all'elaborazione dei dati, come riportato nel paragrafo 3.5 in Materiali e metodi, sono state prodotte delle curve, presenti successivamente, che mostrano l'evoluzione dei batteri nelle *long term culture*.

Infine, l'ultimo metodo di valutazione è stata la real time PCR che ha permesso di quantificare la presenza di *Pseudomonas fluorescens* nei vari tempi di crescita. In particolare, come riportato in Materiali e Metodi, è stato amplificato il gene *rpoD*. Il processo ha visto le stesse procedure per i 4° C e per i 22 °C, in seguito è stata svolta un'analisi dei risultati ottenuti. In particolare, al termine della corsa, sono stati analizzati: i *crossing point* (Cp) dei vari campioni, le *melting curve*, la riproducibilità tra i replicati. Utilizzando l'equazione della curva standard e il *crossing point* del campione restituito dalla corsa di PCR real-time è stato possibile calcolare il logaritmo del numero di copie di DNA e risalire poi al numero di copie di DNA presenti nel campione.

Per tutti e 3 gli approcci è stato svolto un monitoraggio delle colture alle due temperature di incubazione negli stessi tempi, con la differenza che nel caso dei 22 °C è presente anche il dato dei 180 giorni.

4.1.1. Conte cellulari ceppo CECT 378 a 4 °C e a 22°C

Nella Tabella 10 e nella Tabella 11 presenti in allegato 1 sono riportati i risultati ottenuti dalle conte, rispettivamente a 4 e 22 °C, svolte su piastra PAB/CFC per il ceppo CECT 378.

Nel Grafico 1 e nel Grafico 2 sono rappresentate le curve di crescita suddivise per le varie repliche. Il Grafico 3 mostra, invece, una visione generale dell'esperienza: per ogni tempo è presente la media delle 5 repliche divise per temperatura, si trova inoltre una barra di errore calcolata sulla deviazione standard.

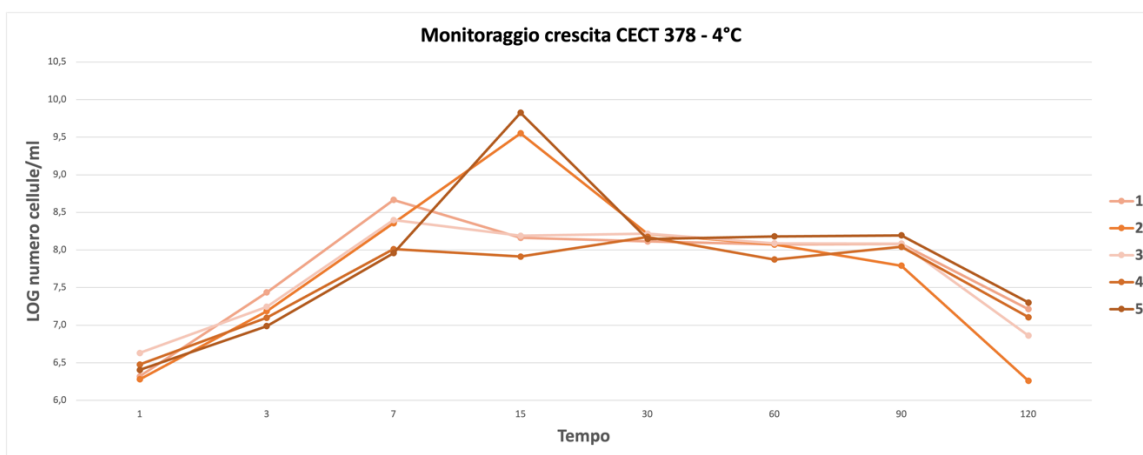


Grafico 1 Visualizzazione grafica delle conte effettuate in terreno PAB/CFC del ceppo CECT 378 a 4 °C.

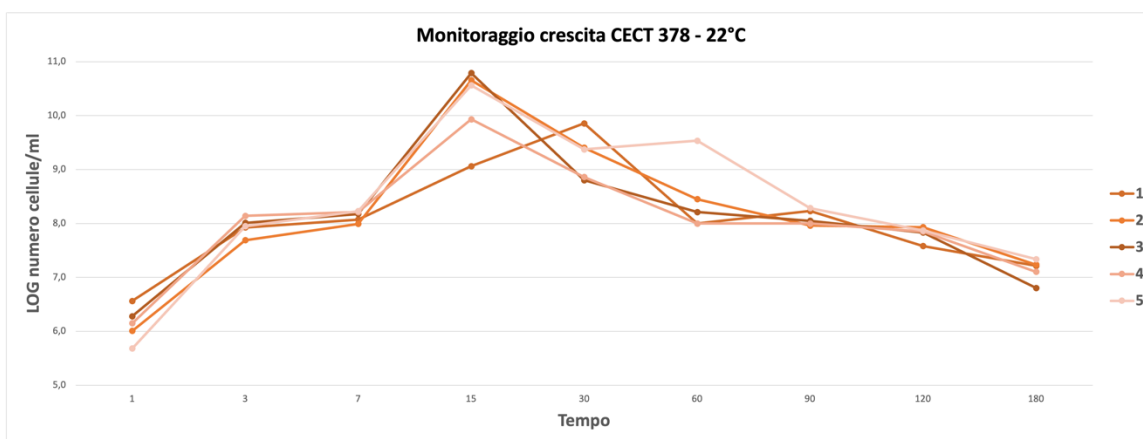


Grafico 2 Visualizzazione grafica delle conte effettuate in terreno PAB/CFC del ceppo CECT 378 a 22 °C.

Come si può notare dal Grafico 3, che confronta i risultati ottenuti con le 2 diverse temperature, si vede come non siano presenti notevoli differenze. Il maggior distacco tra le 2 curve è presente al tempo 15 dove però è riscontrabile un errore maggiore, come evidenziato dalle stesse barre di errore.

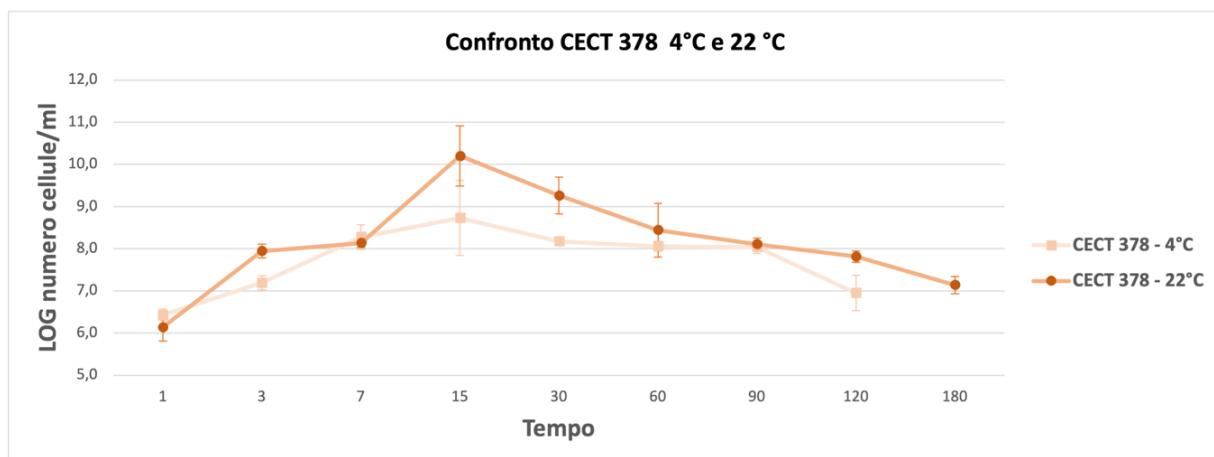


Grafico 3 Visualizzazione grafica del confronto dei risultati ottenuti alle 2 temperature di incubazione. Nel grafico è presente una barra di errore calcolata sulla deviazione standard.

4.1.2. Conte cellulari ceppo L3_4 a 4 °C e a 22°C

Nella Tabella 12 e nella Tabella 13 presenti in allegato 1 sono presenti i risultati ottenuti dalle conte, rispettivamente a 4 e 22 °C, per il ceppo L3_4.

Nel Grafico 4 e nel Grafico 5 sono rappresentate le curve di crescita suddivise per le varie repliche. Il Grafico 6 mostra la visione generale dell'esperimento con i valori medi ottenuti, in questo ceppo i valori ottenuti alle 2 temperature di incubazione risultano molto sovrapponibili con differenze molto limitate.

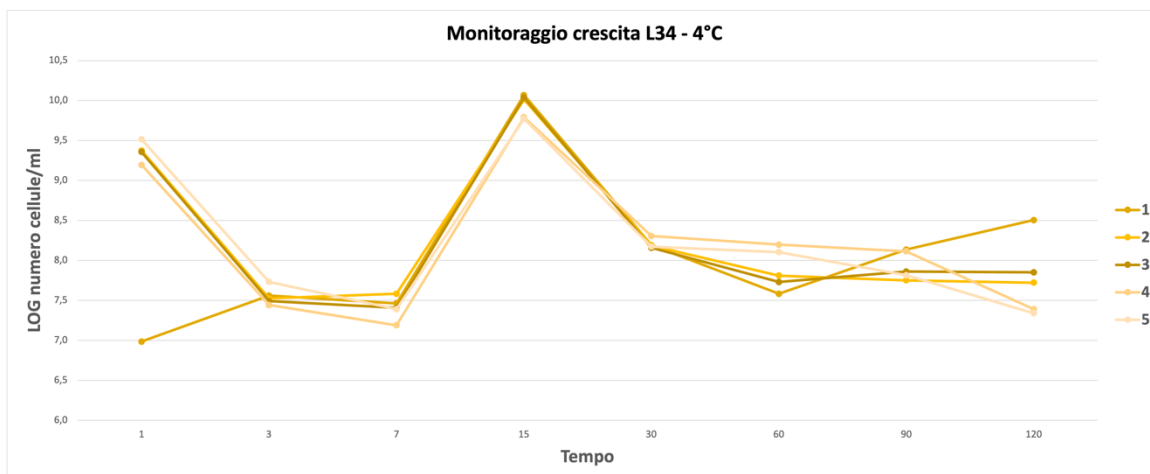


Grafico 4 Visualizzazione grafica delle conte effettuate in terreno PAB/CFC del ceppo L3_4 a 4 °C.

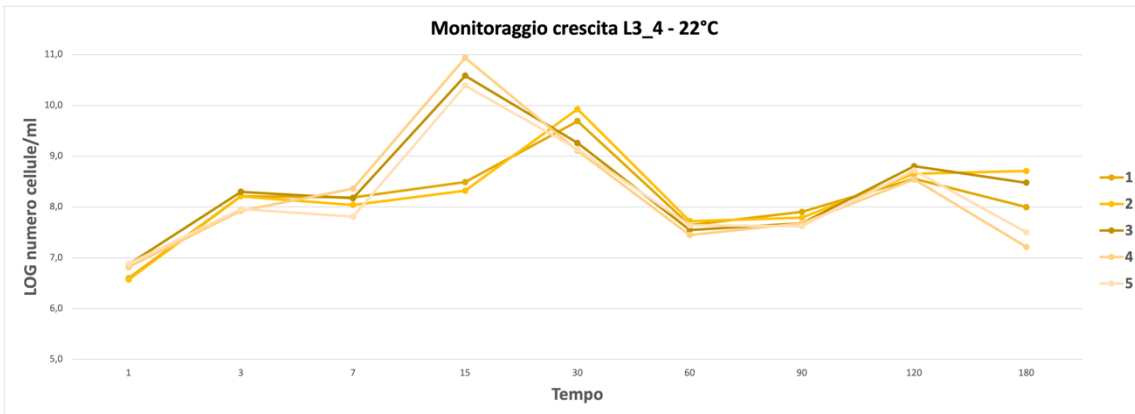


Grafico 5 Visualizzazione grafica delle conte effettuate in terreno PAB/CFC del ceppo L3_4 a 22 °C.

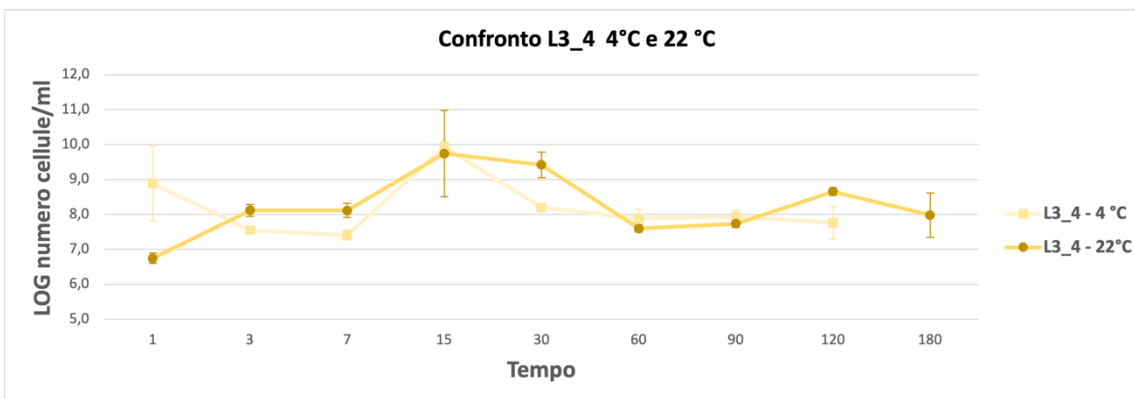


Grafico 6 Visualizzazione grafica del confronto dei risultati ottenuti alle 2 temperature di incubazione. Nel grafico è presente una barra di errore calcolata sulla deviazione standard.

4.1.3. Monitoraggio uk1 alle temperature di 4 °C e 22°C

Come nei precedenti monitoraggi nella Tabella 14 e nella Tabella 15, in allegato 1, sono presenti i risultati ottenuti dalle conte per il ceppo uk1.

Anche in questo caso il Grafico 7 e il Grafico 8 mostrano le curve di crescita, mentre il Grafico 9 permette di svolgere un confronto tra le 2 temperature di incubazione. Come per i ceppi precedenti le diverse temperature non sembrano portare a diversità evidenti nella crescita.

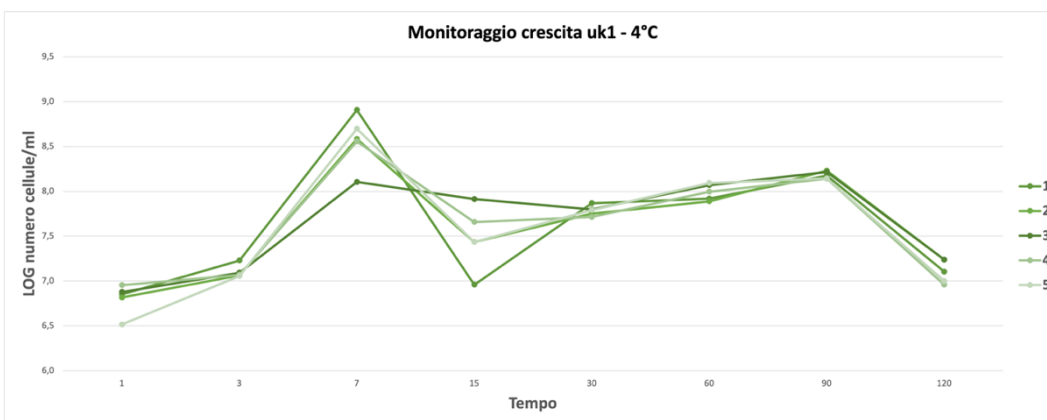


Grafico 7 Visualizzazione grafica delle conte effettuate in terreno PAB/CFC del ceppo uk1 a 4 °C.

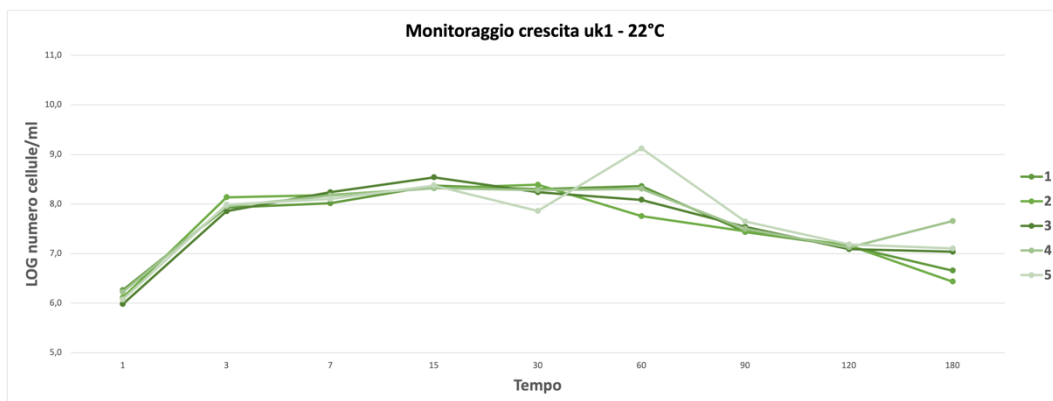


Grafico 8 Visualizzazione grafica delle conte effettuate in terreno PAB/CFC del ceppo uk1 a 22 °C.

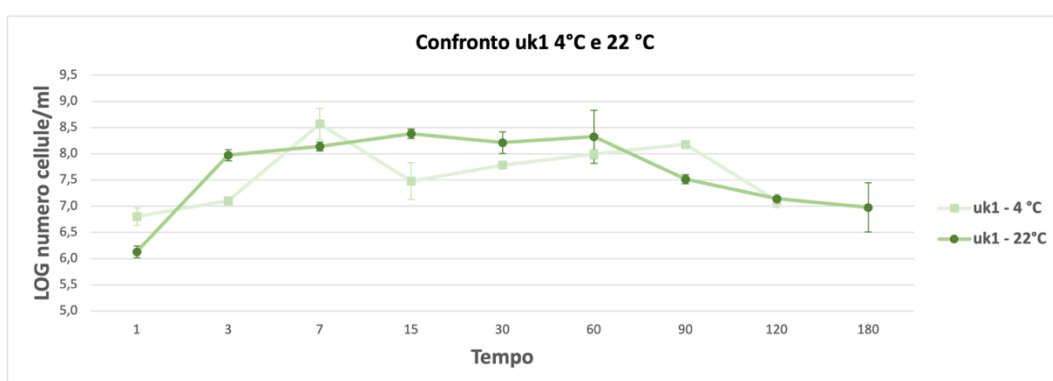


Grafico 9 Visualizzazione grafica del confronto dei risultati ottenuti alle 2 temperature di incubazione. Nel grafico è presente una barra di errore calcolata sulla deviazione standard.

4.1.4. Confronto delle crescite batteriche dei tre ceppi a 4 °C

Nell'allegato 2 sono riportate la Tabella 16, la Tabella 17 e la Tabella 18 con i valori ottenuti in seguito all'elaborazione dei dati. È stata calcolata la media e la deviazione standard rispetto alla media, il risultato è visibile nei vari grafici. Nell'esperienza a 4 °C la misurazione è stata svolta al tempo: 0, 7, 15, 20, 30, 60, 90, 120 giorni. Risulta importante ricordare che nel caso di uk1 possono essere presenti valori più elevati in quanto il ceppo produce pigmento di colore nero che va ad alterare la misurazione aumentandone il valore.

Con i dati riportati nelle tabelle è stato prodotto il Grafico 10 che raggruppa i risultati dei 3 ceppi in un'unica rappresentazione, per svolgere un confronto più semplice.

Risulta evidente come i ceppi CECT 378 e uk1 presentino dei risultati sovrapponibili che producono delle curve abbastanza lineari. I valori dei 2 ceppi vanno a dividersi solo in prossimità del tempo. Questo è dovuto molto facilmente alla produzione di pigmento nero da parte di uk1.

Il ceppo L3_4 presenta invece una curva differente. I valori di assorbanza sono più elevati a partire dal tempo 15, momento in cui è presente anche un maggior numero di cellule/ml come riportato dai risultati ottenuti dalle conte su piastra. Questo ceppo, però, dal tempo 30 raggiunge una fase di plateau che lo porta nei livelli medi degli altri 2 ceppi al tempo 120.

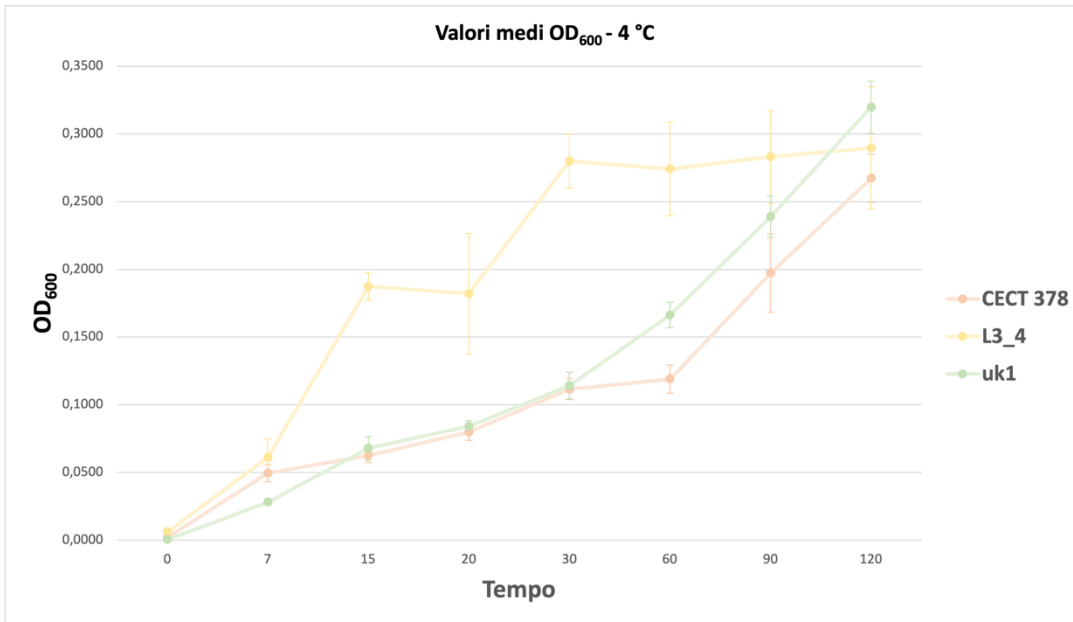


Grafico 10 Rappresentazione grafica dei valori medi ottenuti dalla lettura OD₆₀₀ per i 3 ceppi a 4°C. Nel grafico è presente una barra di errore rappresentata dalla deviazione standard.

4.1.5. Confronto delle crescite batteriche dei tre ceppi a 22 °C

Nella Tabella 19, nella Tabella 20 e nella Tabella 21 presenti nell'allegato 2 sono riportati i valori ottenuti dalla misurazione a OD₆₀₀. L'elaborazione ha visto lo stesso processo dei 4 °C, i tempi di misurazione sono però stati: 0, 3, 6, 9, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180 giorni. Anche in questo caso è importante ricordare che la produzione di pigmento nero da parte di uk1 può portare a valori di assorbanza più elevati.

Nel Grafico 11 sono rappresentati i dati raccolti nelle tabelle. Le curve che si generano, anche in questo caso, risultano abbastanza sovrapponibili. Il ceppo uk1 a partire dal tempo 20 vede dei valori più elevati dovuti, come detto in precedenza, alla produzione di pigmento. È importante notare che nonostante siano presenti dei valori maggiori in questo ceppo, si produce comunque una curva simile, nella forma, a quella di L3_4 e di CECT 378.

In generale le curve prodotte dai 3 ceppi hanno un andamento differente rispetto a quelle ottenute dai 4 °C: i massimi valori vengono raggiunti tra il tempo 15 e il tempo 20, invece che intorno al tempo 120 come si vede nel Grafico 10. Infine, in seguito a questo picco è presente una fase di discesa, non presente nell'esperimento a 4°C

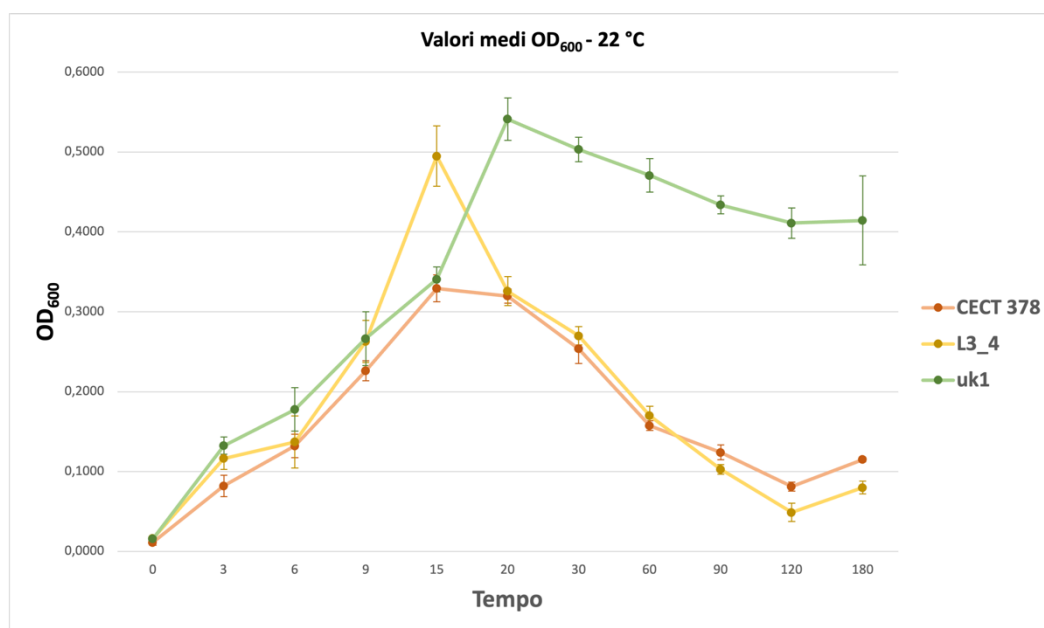


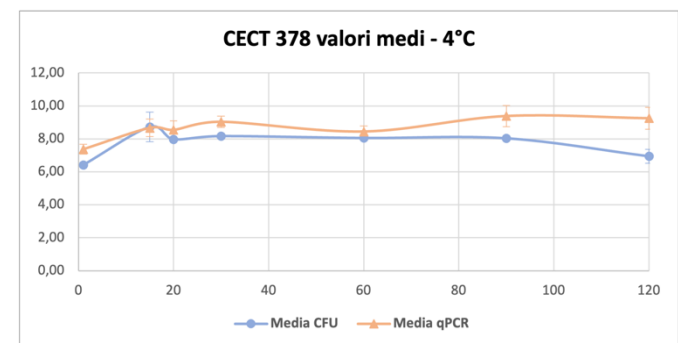
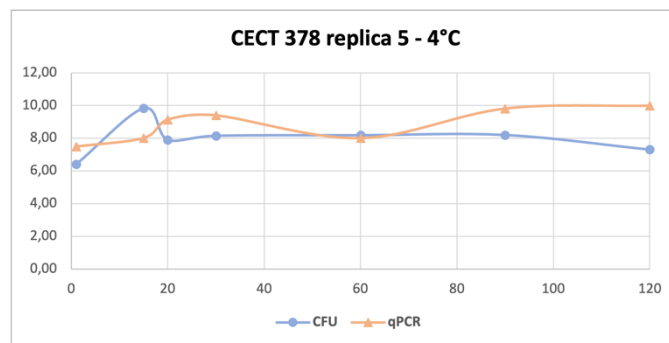
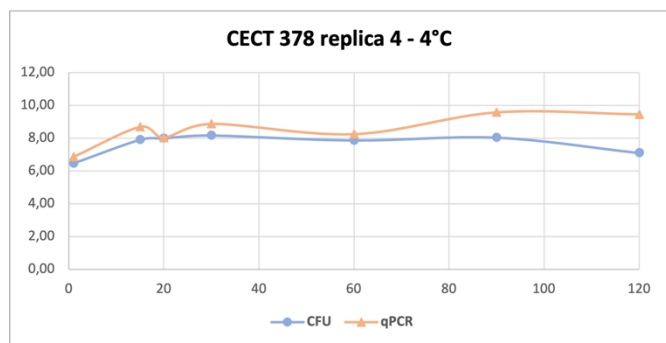
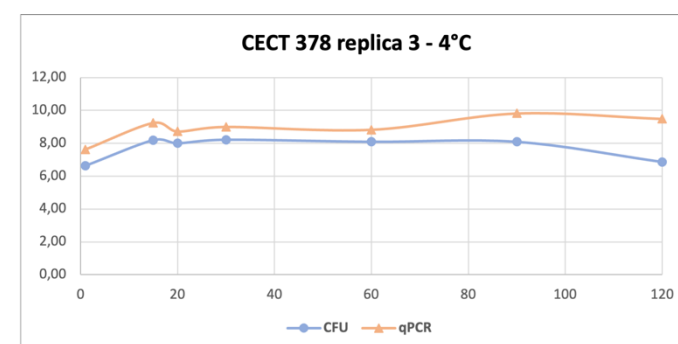
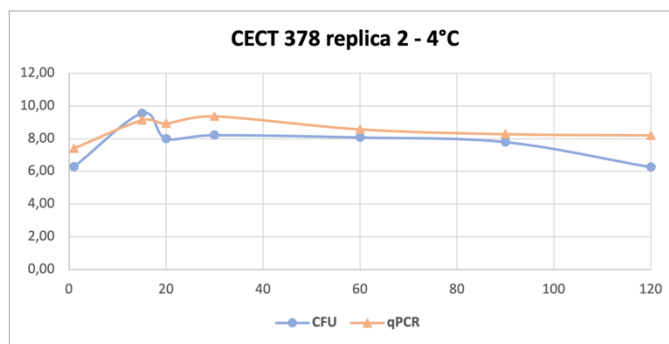
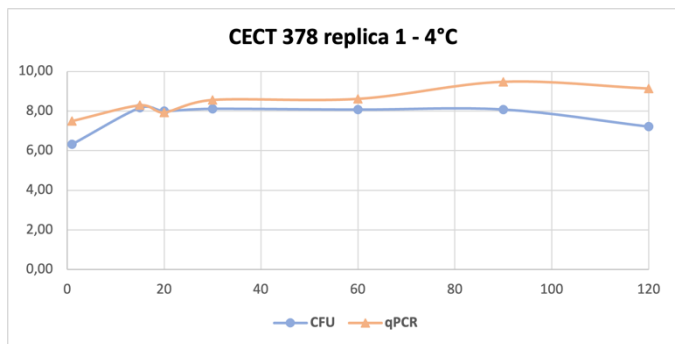
Grafico 11 Rappresentazione grafica dei valori medi ottenuti dalla lettura OD₆₀₀ per i 3 ceppi a 22°C. Nel grafico è presente una barra di errore rappresentata dalla deviazione standard.

4.1.6. Valutazione della concentrazione batterica con Real Time PCR

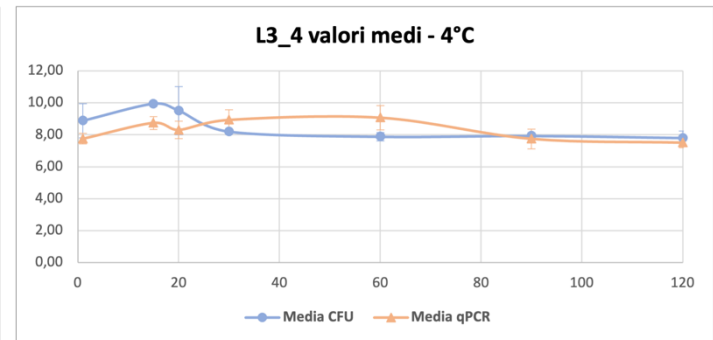
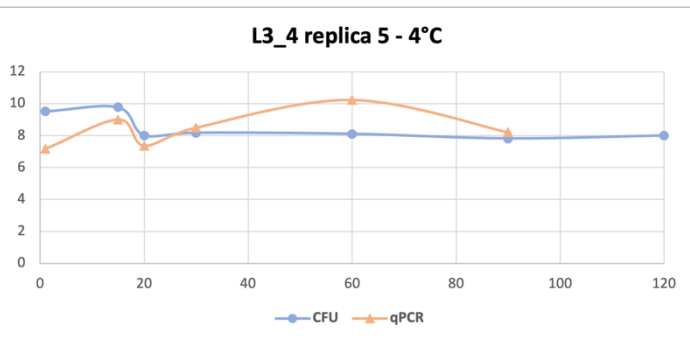
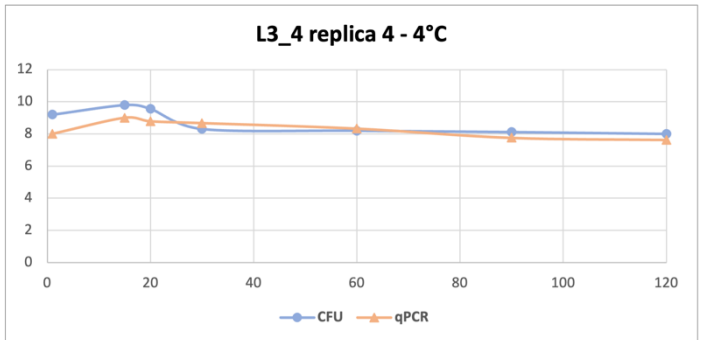
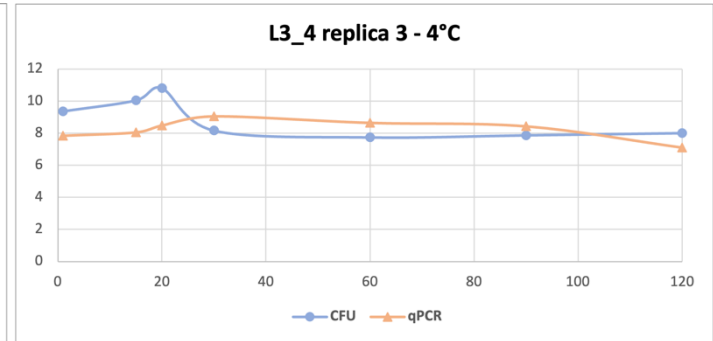
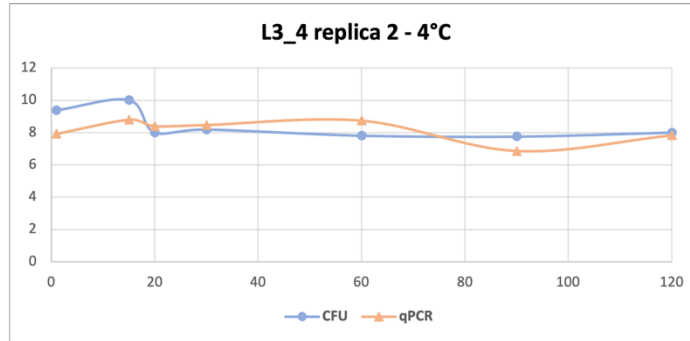
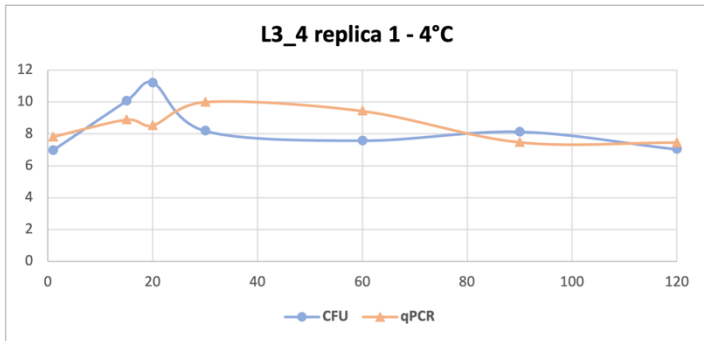
Nell'allegato 3 sono presenti le tabelle (Gruppo di tabelle 3) con i logaritmi in base 10 dei valori medi ottenuti in seguito all'elaborazione dei dati. Sui dati è stata anche calcolata la deviazione standard utilizzata per inserire una barra di errore nel grafico con i valori medi.

Nelle pagine successive, invece, sono presenti in ordine, prima per l'esperimento a 4 °C e poi per quella a 22 °C, i grafici con i risultati ottenuti per CECT 378 (Gruppo di grafici 1 e Gruppo di grafici 4), L3_4 (Gruppo di grafici 2 e Gruppo di grafici 5) e uk1 (Gruppo di grafici 3 e Gruppo di grafici 6). In particolare, sono riportati i singoli grafici per le 5 repliche ed un sesto grafico che tiene conto dei valori medi ottenuti. Quest'ultimo presenta la deviazione standard dei valori come barra di errore.

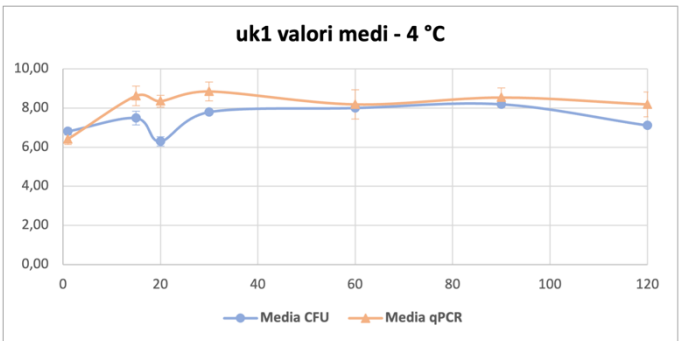
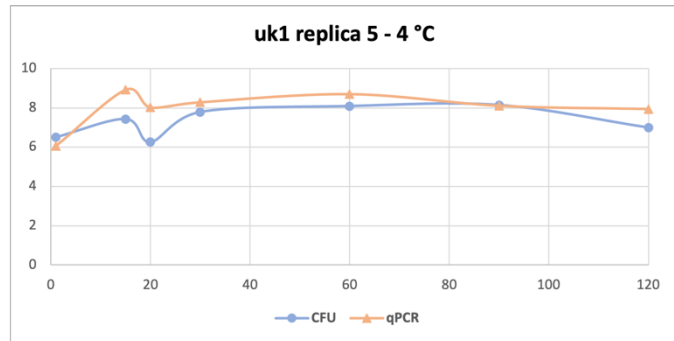
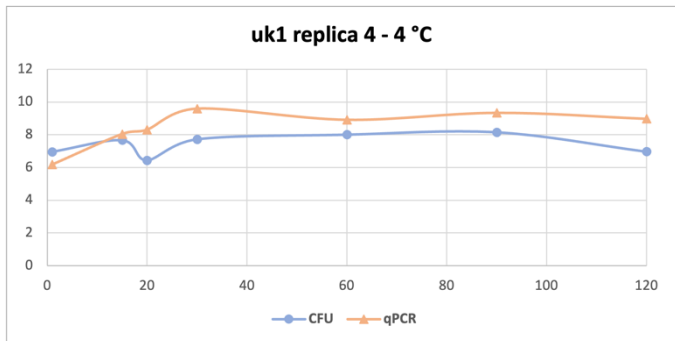
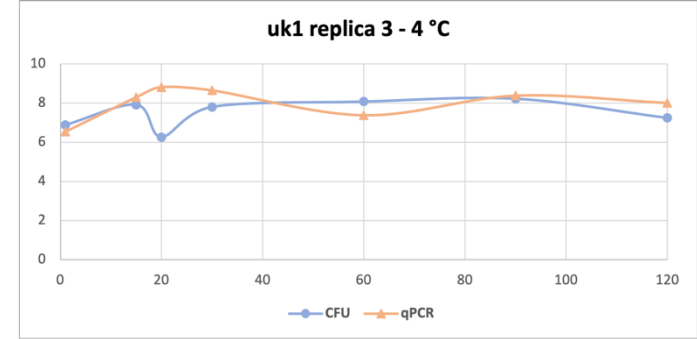
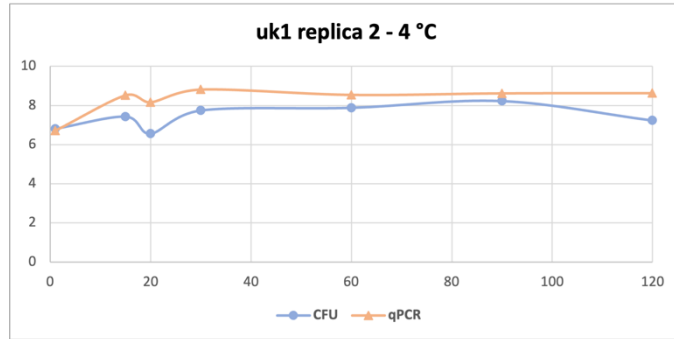
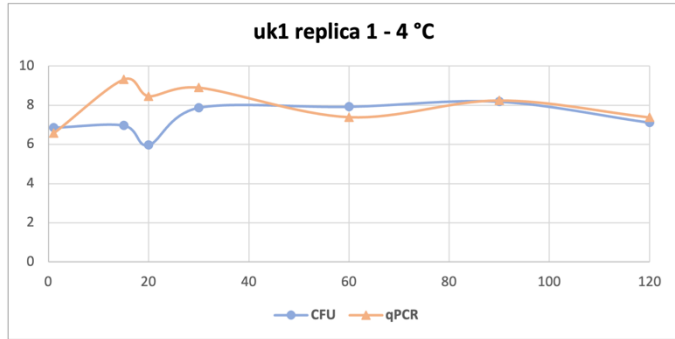
È importante ricordare che il colorante PMAxx è stato utilizzato per tutti i risultati a 4 °C e solo per il tempo 120 e il tempo 180 nell'esperienza a 22 °C.



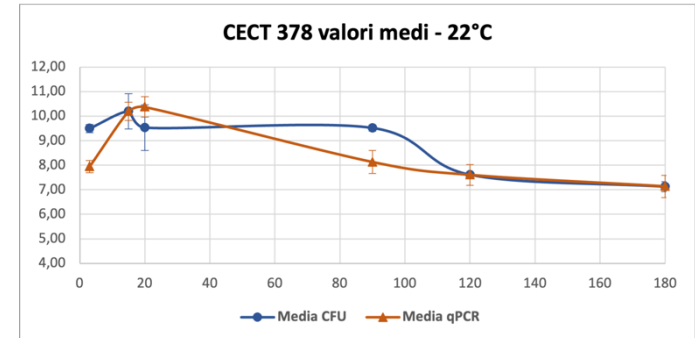
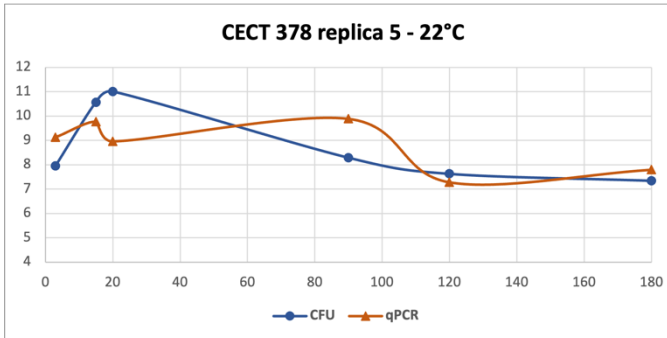
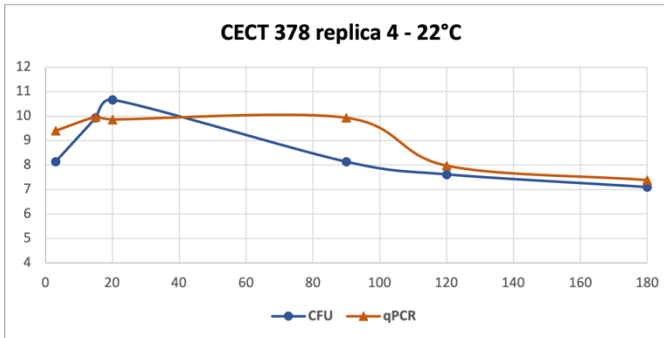
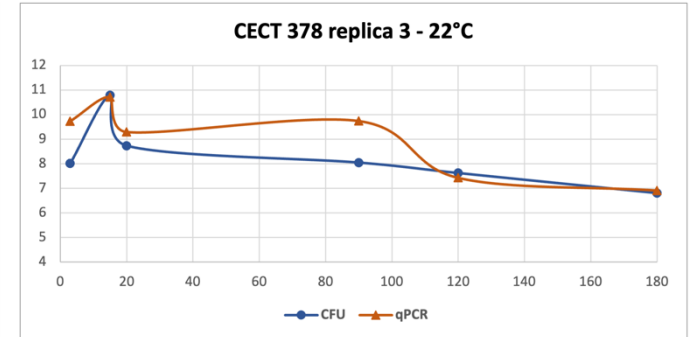
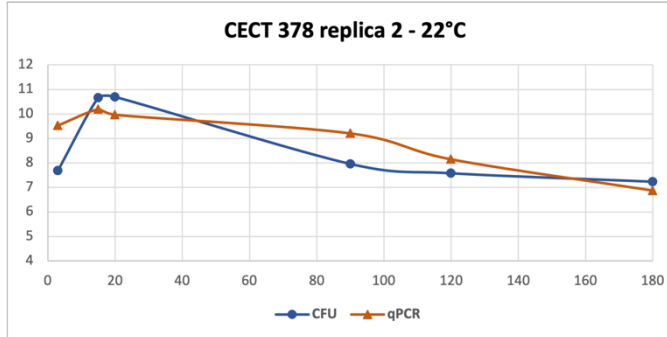
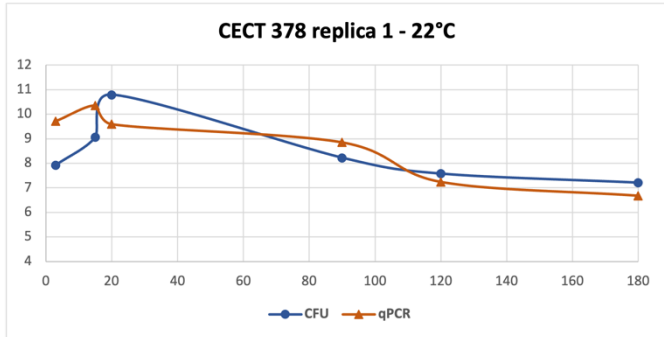
Gruppo di grafici 1 Rappresentazione grafica del confronto dei valori ottenuti in qPCR e in conta su piastra (CFU) per CECT 378 a 4 °C.
L'ultimo grafico riporta i valori medi delle 5 repliche con la deviazione standard come barra d'errore.



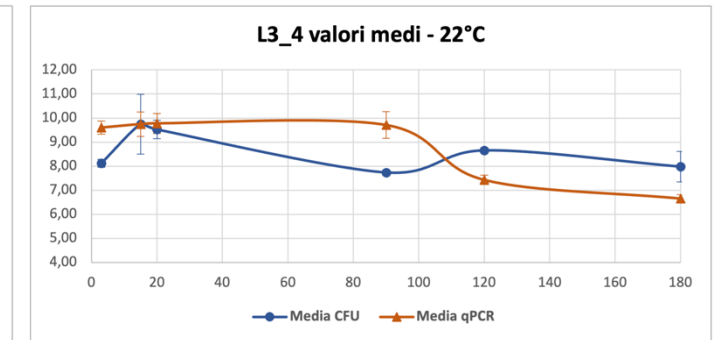
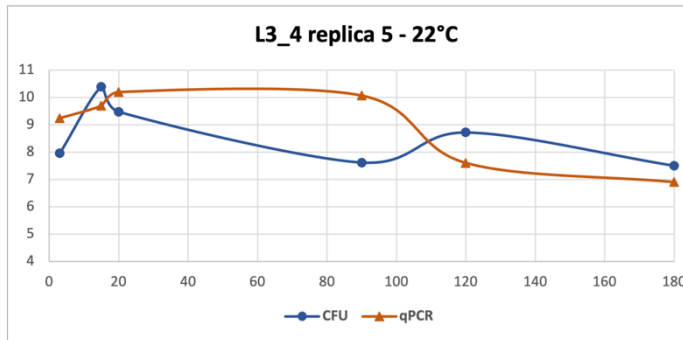
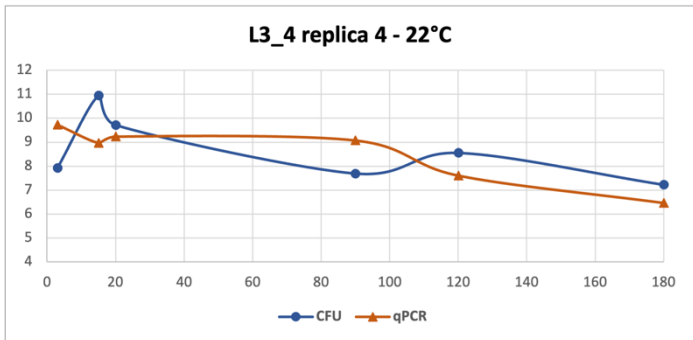
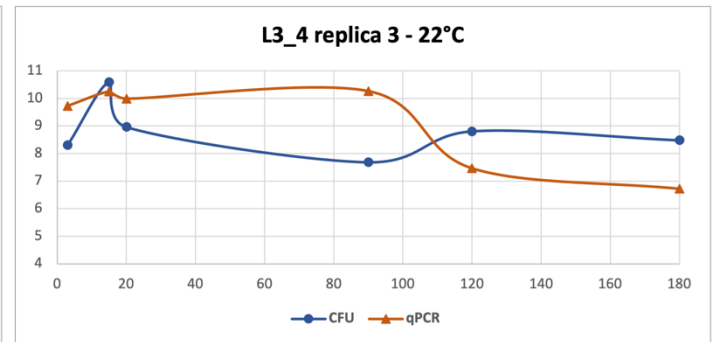
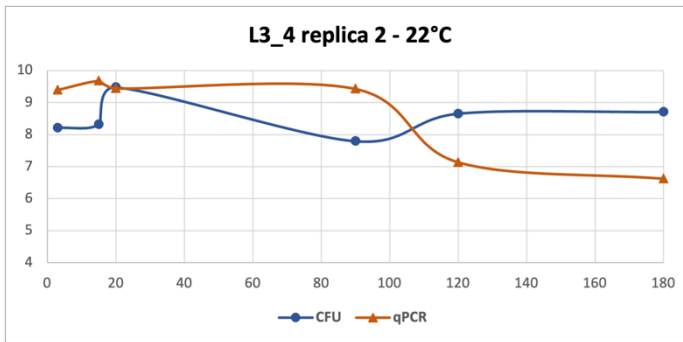
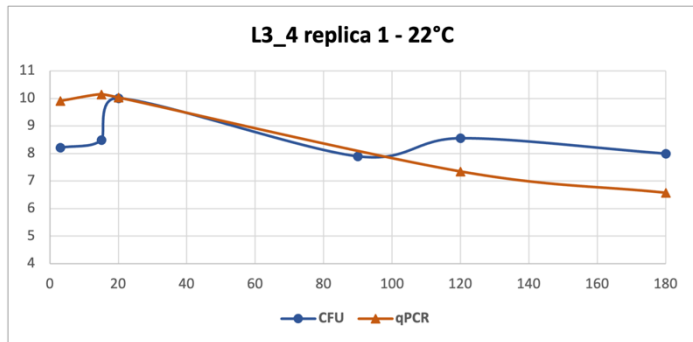
Gruppo di grafici 2 Rappresentazione grafica del confronto dei valori ottenuti in qPCR e in conta su piastra (CFU) per L3_4 a 4 °C. L'ultimo grafico riporta i valori medi delle 5 repliche con la deviazione standard come barra d'errore.



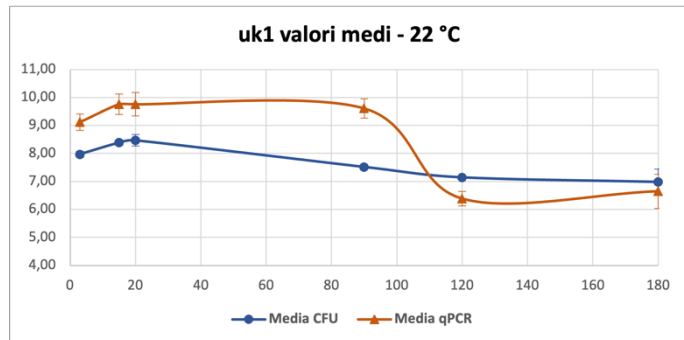
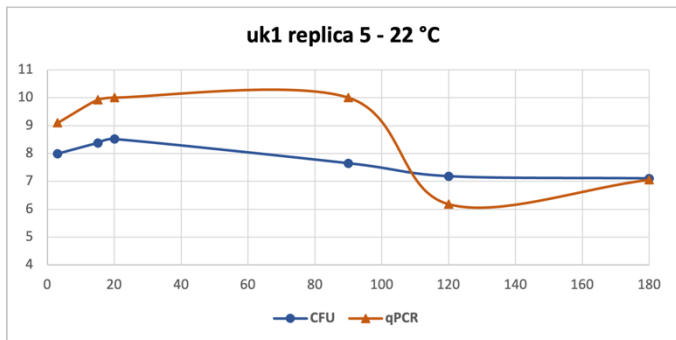
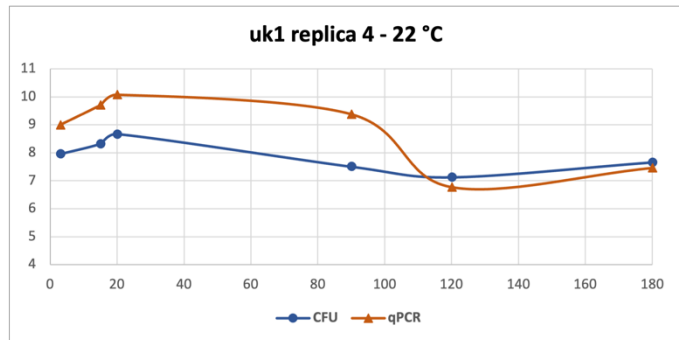
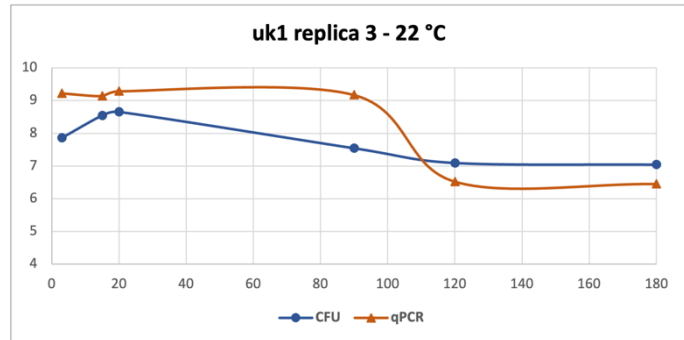
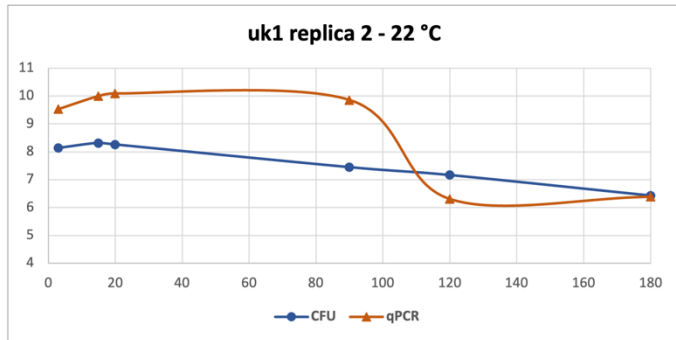
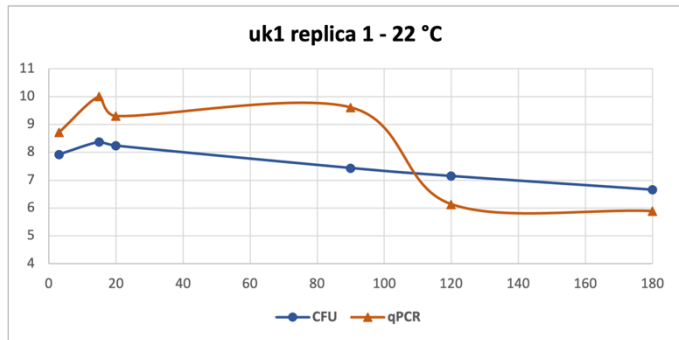
Gruppo di grafici 3 Rappresentazione grafica del confronto dei valori ottenuti in qPCR e in conta su piastra (CFU) per uk1 a 4 °C. L'ultimo grafico riporta i valori medi delle 5 repliche con la deviazione standard come barra d'errore.



Gruppo di grafici 4 Rappresentazione grafica del confronto dei valori ottenuti in qPCR e in conta su piastra (CFU) per CECT 378 a 22 °C.
L'ultimo grafico riporta i valori medi delle 5 repliche con la deviazione standard come barra d'errore.



Gruppo di grafici 5 Rappresentazione grafica del confronto dei valori ottenuti in qPCR e in conta su piastra (CFU) per L3_4 a 22 °C. L'ultimo grafico riporta i valori medi delle 5 repliche con la deviazione standard come barra d'errore.



Gruppo di grafici 6 Rappresentazione grafica del confronto dei valori ottenuti in qPCR e in conta su piastra (CFU) per uk1 a 22 °C. L'ultimo grafico riporta i valori medi delle 5 repliche con la deviazione standard come barra d'errore.

4.2. Valutazione della capacità di formare biofilm

La capacità dei vari ceppi di produrre biofilm è un elemento che può essere associato alla persistenza.

Il test è stato svolto per tutti i ceppi, sia per l'esperimento a 4 °C gradi sia per quello a 22 °C, per entrambi i dati sono stati elaborati in egual modo. Le tempistiche di esecuzione sono state: tempo zero, 30 giorni, 60 giorni, 90 giorni, 120 giorni, 180 giorni (solo per l'esperienza a 22 °C).

Per ognuno dei 15 tubi (5 per ceppo) sono state analizzate 5 repliche, per le quali è stata valutata l'assorbanza delle cellule adese in biofilm (OD₅₇₀) e delle cellule planctoniche in sospensione (OD₆₀₀). In seguito all'elaborazione dei dati, come riportato nel paragrafo 3.6 in materiali e metodi, sono stati raccolti i valori in tabelle e a ciascun valore di assorbanza media è stato, inoltre, associato un errore calcolando la deviazione standard rispetto alla media.

In seguito, vengono riportati i vari risultati ottenuti, divisi per ceppo e per temperatura di incubazione (4 °C e 22 °C).

4.2.1. Capacità di formare biofilm a 4 °C

Sono riportate, in allegato 4, le tabelle (Tabella 22, Tabella 23 e Tabella 24) con i valori ottenuti per i quali è stata calcolata il valore medio, che è stato riportato nel Grafico 13. In quest'ultimo è presente una barra di errore che è stata calcolata sulla deviazione standard rispetto alla media.

Dai dati ottenuti si vede come la produzione di biofilm sia un elemento ceppo specifico. In particolare, è possibile vedere nel Grafico 12 al tempo 0, valori molto grandi per L3_4 e per uk1, con una media rispettiva di 311,1570 e di 240,4333. Quest'ultimi risultano molto elevati se confrontati con la media del ceppo CECT 378 di 1,9375.

Dal Grafico 13 è stato escluso il tempo 0 per l'elevata produzione di biofilm, al fine di rendere la visione degli altri tempi meno complessa.

In particolare, si evidenzia in tutti i casi una diminuzione nella produzione di biofilm al tempo 30 seguita da un successivo aumento.

L'aumento evidenziato risulta avvenire prima per L3_4 (al tempo 60), mentre per uk1 è necessario aspettare il tempo 90. CECT 378, come detto in precedenza, produce in tutti i tempi meno biofilm anche se segue comunque l'evoluzione degli altri 2 ceppi.

Per tutti e 3 i ceppi è possibile vedere una diminuzione generale della produzione al tempo 120.

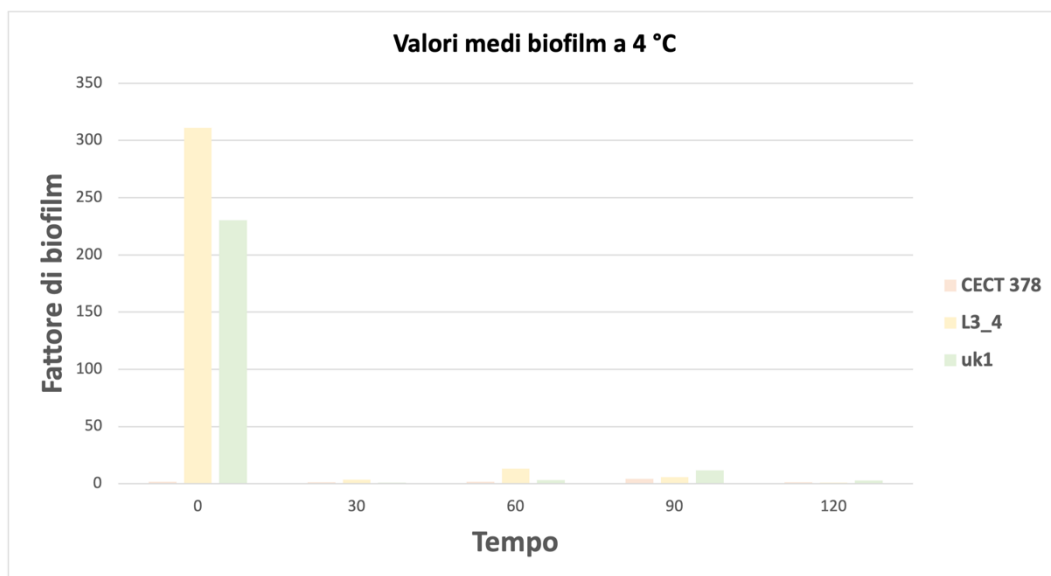


Grafico 12 Rappresentazione grafica dei valori medi ottenuti dal test del biofilm per i 3 ceppi a 4 °C.

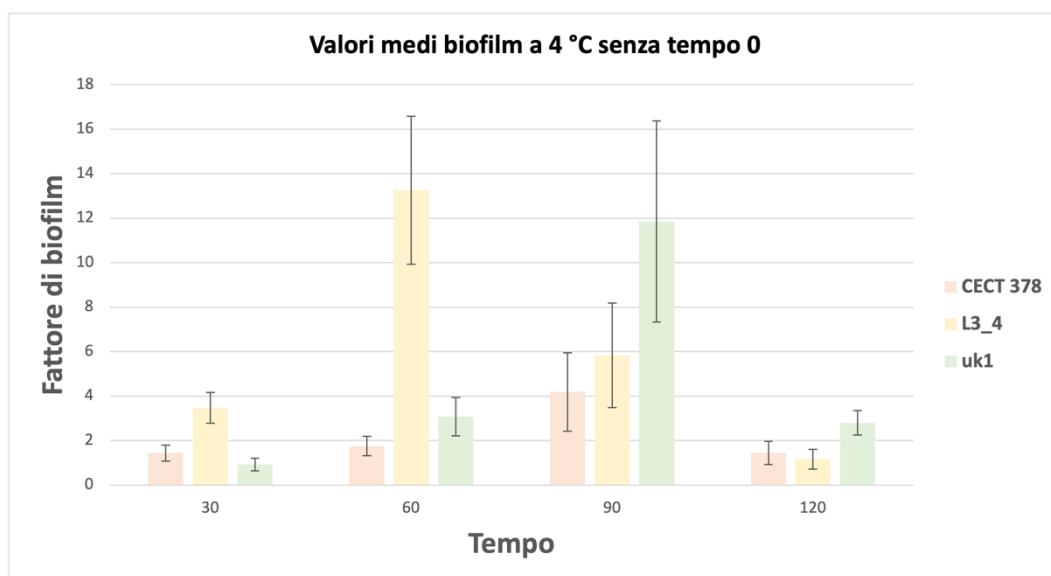


Grafico 13 Rappresentazione grafica dei valori medi ottenuti dal test del biofilm per i 3 ceppi a 4 °C (escluso il tempo 0). Nel grafico è presente una barra di errore rappresentata dalla deviazione standard.

Infine, è stata svolta un'analisi statistica con il test riportato nel paragrafo 3.6, in materiali e metodi. Lo scopo è stato andare a confrontare i valori di biofilm ottenuti nei vari tempi a 4°C, questo col fine di vedere se c'è differenza significativa e quindi cambiamenti nel tempo. In seguito, è riportato il Gruppo di tabelle 1 con i valori di p-value ottenuti dall'analisi in R-studio (i valori evidenziati in rosso sono significativi).

Valori p-value test biofilm CECT 378 - 4 °C				
	0	30	60	90
30	0,44	-	-	-
60	1	0,52	-	-
90	0,14	0,14	0,14	-
120	0,58	0,93	0,58	0,14

Valori p-value test biofilm uk1 - 4 °C				
	0	30	60	90
30	0,0099	-	-	-
60	0,0099	0,0099	-	-
90	0,1675	0,0099	0,0099	-
120	0,0099	0,0099	0,6905	0,0099

Valori p-value test biofilm L3_4 - 4 °C				
	0	30	60	90
30	1	-	-	-
60	0,767	0,02	-	-
90	0,767	0,079	0,026	-
120	0,026	0,02	0,02	0,02

Gruppo di tabelle 1 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica del test biofilm a 4 °C. Sono evidenziati in rosso i risultati significativi.

4.2.2. Capacità di formare biofilm a 22 °C

Come detto in precedenza l'elaborazione dei dati per il test a 22 °C ha avuto lo stesso procedimento dei 4 °C, con l'unica differenza che in questo caso è presente anche il tempo 180 giorni. Nell'allegato 4 sono presenti le tabelle (Tabella 25, Tabella 26 e Tabella 27) con i valori ottenuti, successivamente sono visibili i grafici con la rappresentazione dei risultati.

Anche in questo caso, come con l'esperimento a 4 °C, sono stati prodotti 2 grafici distinti: il Grafico 14 con tutti i valori ottenuti e il Grafico 15 senza il tempo 0 e il tempo 180 per i valori elevati ottenuti in questi intervalli, in quest'ultimo è presente e una barra di errore calcolata sulla deviazione standard rispetto alla media.

Risulta evidente come la produzione di biofilm risulti essere ceppo specifica con valori generali per CECT 378 molto più bassi rispetto agli altri 2 ceppi analizzati. Quest'ultimo, inoltre, a differenza di L3_4 e uk1 mantiene per tutti i 180 giorni valori molto costanti, senza drastici cambiamenti.

Il ceppo L3_4 presenta valori elevatissimi al tempo 0, negli intervalli successivi è presente una diminuzione, che vede però un risalita al tempo 60 seguita da un ulteriore calo.

Anche uk1 presenta valori molto elevati all'inizio dell'esperimento, questi negli altri tempi risultano essere molto più bassi per poi avere un'enorme risalita al tempo finale. In generale tutti e 3 i ceppi vedono un aumento al tempo 180. Questa capacità di produrre maggior quantità di biofilm nei lunghi intervalli può essere associata alla stessa persistenza.

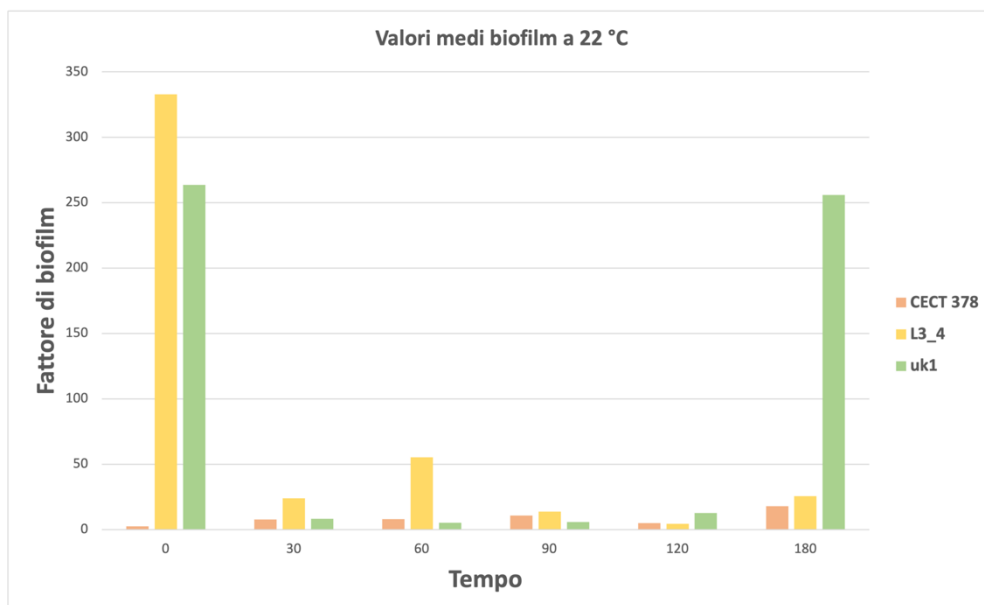


Grafico 14 Rappresentazione grafica dei valori medi ottenuti dal test del biofilm per i 3 ceppi a 22 °C.

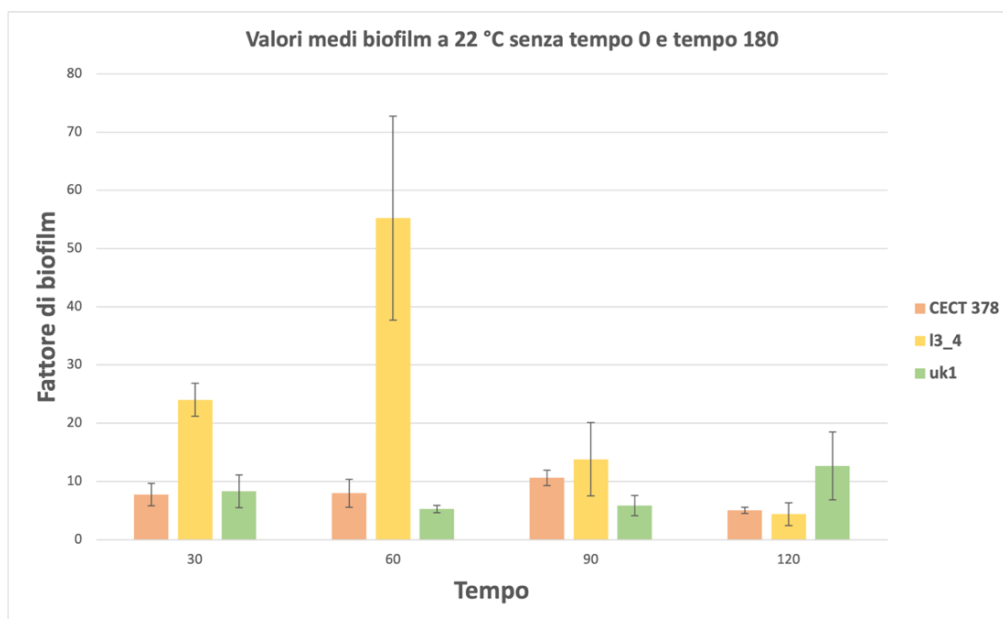


Grafico 15 Rappresentazione grafica dei valori medi ottenuti dal test del biofilm per i 3 ceppi a 22 °C (escluso tempo 0 e tempo 180). Nel grafico è presente una barra di errore rappresentata dalla deviazione standard.

Anche per l'esperimento a 22 °C è stata svolta un'analisi statistica con il test riportato nel paragrafo 3.6, in materiali e metodi. Lo scopo, come nei 4 °C, è stato quello di confrontare i valori di biofilm ottenuti nei vari tempi al fine di evidenziare la presenza di cambiamenti nel tempo. In seguito, è riportato il Gruppo di tabelle 2 con i valori di p-value ottenuti dall'analisi in R-studio (i valori evidenziati in rosso sono significativi).

Valori p-value test biofilm CECT 378 - 22 °C					
	0	30	60	90	120
30	0,017	-	-	-	-
60	0,017	1	-	-	-
90	0,017	0,048	0,064	-	-
120	0,017	0,03	0,048	0,017	-
180	0,017	0,064	0,064	0,162	0,017

Valori p-value test biofilm uk1 - 22 °C					
	0	30	60	90	120
30	0,02	-	-	-	-
60	0,017	0,261	-	-	-
90	0,017	0,261	0,74	-	-
120	0,017	0,34	0,017	0,083	-
180	1	0,02	0,017	0,017	0,017

Valori p-value test biofilm L3_4 - 22 °C					
	0	30	60	90	120
30	0,012	-	-	-	-
60	0,162	0,012	-	-	-
90	0,012	0,012	0,012	-	-
120	0,012	0,012	0,012	0,069	-
180	0,012	0,841	0,022	0,11	0,012

Gruppo di tabelle 2 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica del test biofilm a 22 °C. Sono evidenziati in rosso i risultati significativi.

4.3. Identificazione dei persisters

L'esposizione ad un antibiotico verso il quale il ceppo è sensibile può essere utilizzato per isolare i persisters. Infatti, le cellule batteriche in stato persisters sono tolleranti all'antibiotico e quindi in grado di crescere.

Il trattamento con la kanamicina ha quindi permesso di andare a evidenziare la presenza di cellule persistenti, come riportato in Materiali e Metodi.

In particolare, questo protocollo è stato applicato per il tempo 180 per l'esperimento a 22 °C e per il tempo 90 e 120 per l'esperimento a 4 °C.

In seguito, è riportata la Tabella 8 con i risultati ottenuti a 4 °C e la Tabella 9 con i risultati a 22 °C. Le caselle colorate in rosso hanno dato esito positivo, il valore al loro interno è il numero di colonie contate (n.c. sta per non contabili).

Esperimento 4 °C	Tempo 90	Tempo 120
CECT 378 replica 1		n.c.
CECT 378 replica 2	n.c.	n.c.
CECT 378 replica 3	n.c.	n.c.
CECT 378 replica 4	n.c.	n.c.
CECT 378 replica 5	n.c.	n.c.
L3_4 replica 1		
L3_4 replica 2		5
L3_4 replica 3		
L3_4 replica 4		24
L3_4 replica 5		
uk1 replica 1	5	
uk1 replica 2	12	2
uk1 replica 3	3	1
uk1 replica 4		
uk1 replica 5		1

Tabella 8 Risultati ottenuti in seguito all'identificazione dei persisters a 4 °C per il tempo 90 e per il tempo 120. Il numero riportato nella casella corrisponde alle colonie contate (n.c. = non contabile).

Esperimento 22 °C	Tempo 180
CECT 378 replica 1	≤300
CECT 378 replica 2	≤300
CECT 378 replica 3	710
CECT 378 replica 4	10
CECT 378 replica 5	436
L3_4 replica 1	10
L3_4 replica 2	8
L3_4 replica 3	
L3_4 replica 4	
L3_4 replica 5	
uk1 replica 1	
uk1 replica 2	
uk1 replica 3	
uk1 replica 4	
uk1 replica 5	

Tabella 9 Risultati ottenuti in seguito all'identificazione dei persisters a 22 °C per il tempo 180. Il numero riportato nella casella corrisponde alle colonie contate (n.c. = non contabile).

4.4.Valutazione della motilità

I test di motilità hanno lo scopo di determinare la capacità dei batteri di muoversi all'interno del mezzo di coltura. In particolare, come riportato in materiali e metodi, sono stati eseguiti 2 test distinti *swimming* e *swarming*.

In seguito al piastramento e all'attesa del tempo di incubazione le piastre ottenute sono state fotografate. Dalle immagini ottenute è stato evidenziato il disegno del contorno delle colonie prodotte al fine di poter calcolarne l'area. I risultati ottenuti sono stati elaborati con lo scopo di ottenere come valore finale l'area media. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti

4.4.1. Risultati *swimming* 4 °C e 22 °C

Nell'allegato 5 sono riportate la Tabella 28 e la Tabella 29 con i valori medi delle aree ottenute. Da questi dati è stato possibile costruire il Grafico 16 e il Grafico 17 riportati nella pagina successiva.

Dai grafici ottenuti è possibile vedere come i ceppi L3_4 e uk1 abbiano una motilità maggiore rispetto a CECT 378. Per quest'ultimo è interessante notare come alla temperatura di 4 °C ci siano state delle aree maggiori rispetto ai 22 °C, indicando una maggiore motilità alle temperature di refrigerazione.

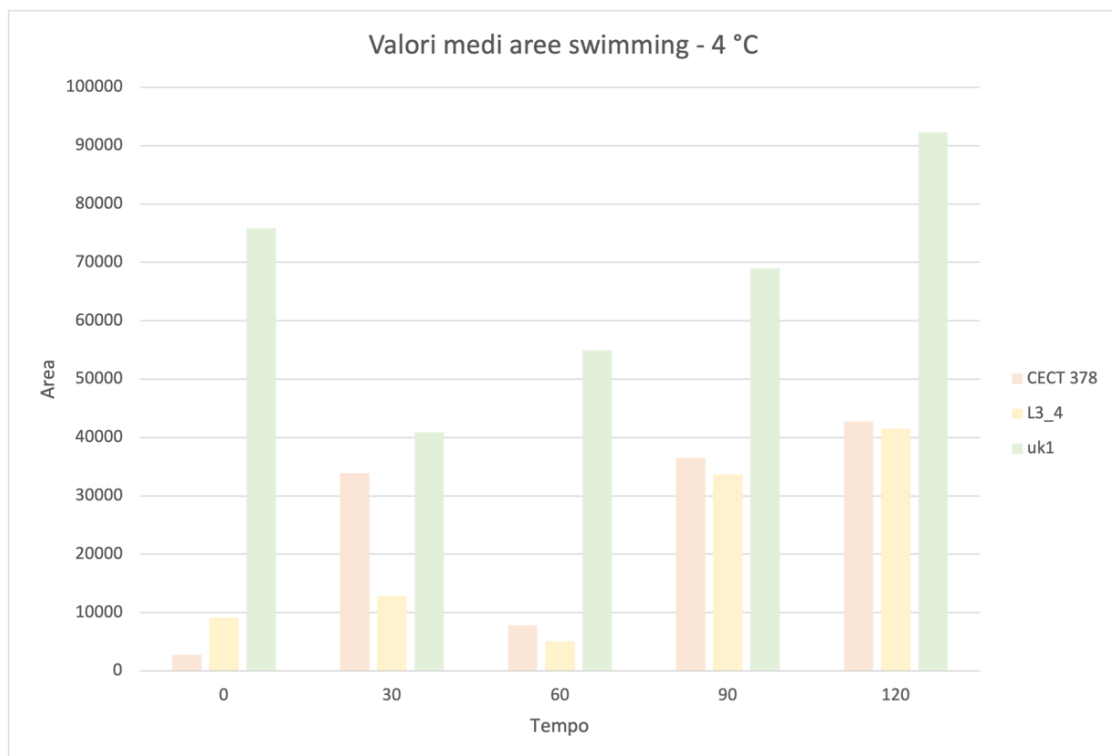


Grafico 16 Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dal test swimming a 4 °C.

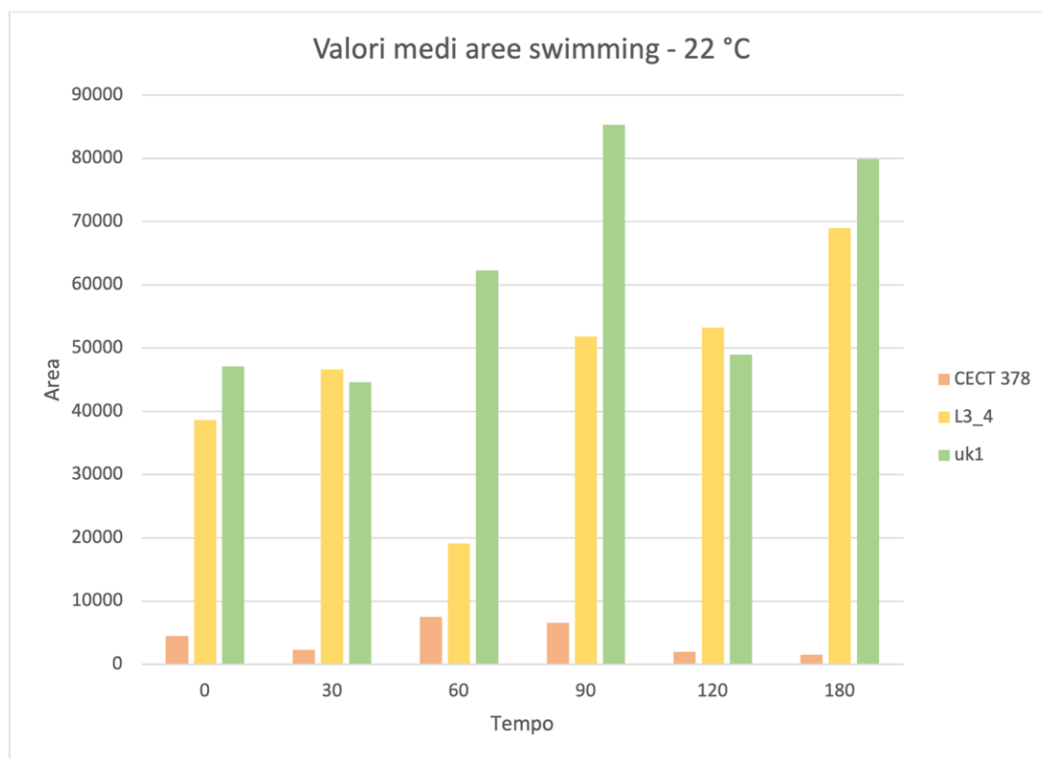


Grafico 17 Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dal test swimming a 22 °C.

Sui dati ottenuti è stata svolta un'analisi statistica con il test riportato nel paragrafo 3.7, in materiali e metodi. Lo scopo è stato quello di svolgere un confronto tra la dimensione delle varie aree ottenuti nei test di *swimming* andando così a capire se ci sono cambiamenti significativi nel tempo. Di seguito sono riportati valori di p-value ottenuti (quelli evidenziati in rosso sono significativi) con il relativo box plot prodotto in R-studio.

Valori p-value swimming CECT 378 - 4 °C				
	T0	T120	T30	T60
T120	0,02	-	-	-
T30	0,02	1	-	-
T60	0,136	0,02	0,063	-
T90	0,02	0,863	1	0,093

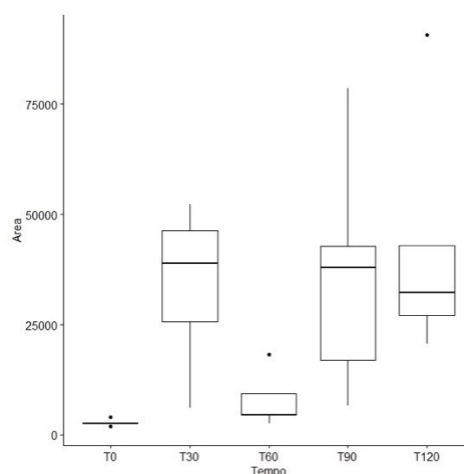


Tabella e Box Plot 1 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swimming CECT 378 - 4 °C.

Valori p-value swimming L3_4 - 4 °C				
	T0	T120	T30	T60
T120	0,159	-	-	-
T30	0,387	0,317	-	-
T60	0,608	0,026	0,032	-
T90	0,026	0,841	0,032	0,026

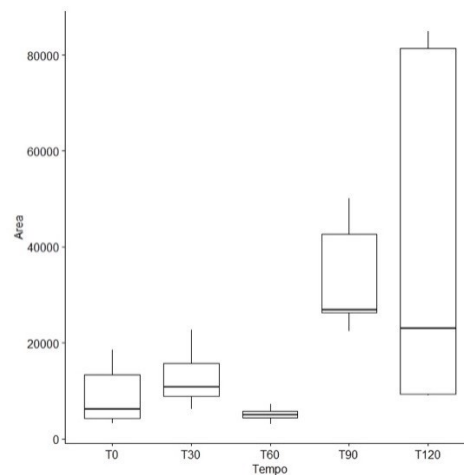


Tabella e Box Plot 2 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swimming L3_4 - 4 °C.

Valori p-value swimming uk1 - 4 °C				
	T0	T120	T30	T60
T120	0,47	-	-	-
T30	0,25	0,16	-	-
T60	0,39	0,16	0,39	-
T90	0,55	0,25	0,25	0,25

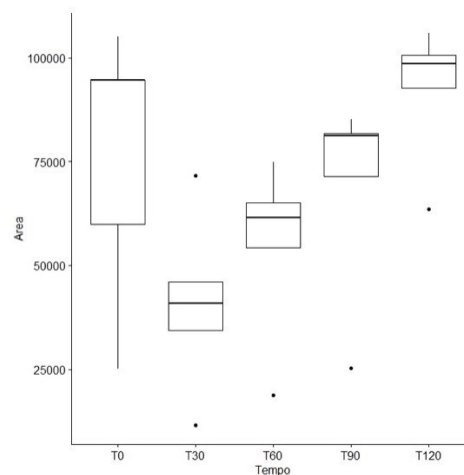


Tabella e Box Plot 3 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swimming uk1 - 4 °C.

Valori p-value swimming CECT 378 - 22 °C					
	T0	T120	T180	T30	T60
T120	0,024	-	-	-	-
T180	0,024	0,143	-	-	-
T30	0,024	0,278	0,143	-	-
T60	1	0,206	0,143	0,143	-
T90	1.000	0,024	0,024	0,143	1

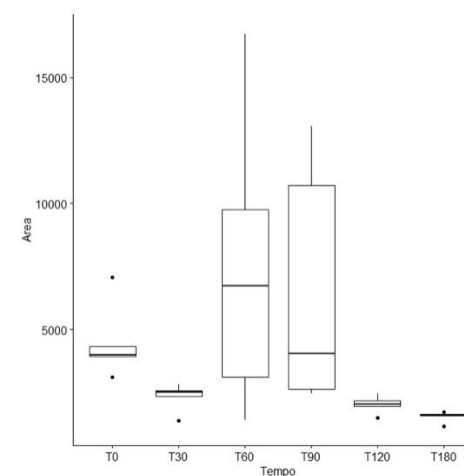


Tabella e Box Plot 4 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swimming CECT 378 - 22 °C.

Valori p-value swimming L3_4 - 22 °C					
	T0	T120	T180	T30	T60
T120	0,74	-	-	-	-
T180	0,45	0,74	-	-	-
T30	0,74	0,74	0,56	-	-
T60	0	0,74	0,45	0,42	-
T90	1	1	0,74	0,74	0,45

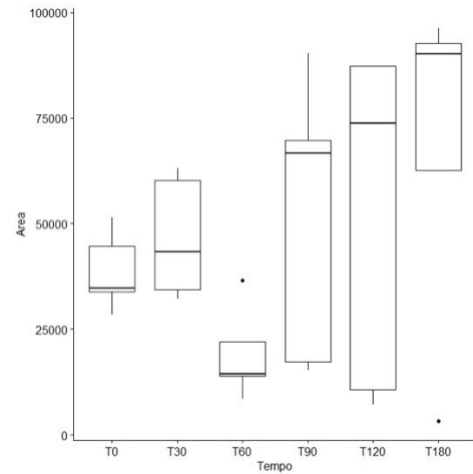


Tabella e Box Plot 5 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swimming L3_4 - 22 °C.

Valori p-value swimming uk1 - 22 °C					
	T0	T120	T180	T30	T60
T120	1	-	-	-	-
T180	0,013	0,013	-	-	-
T30	0,451	0,387	0,013	-	-
T60	0,013	0,022	0,022	0,013	-
T90	0,013	0,013	0,451	0,013	0,013

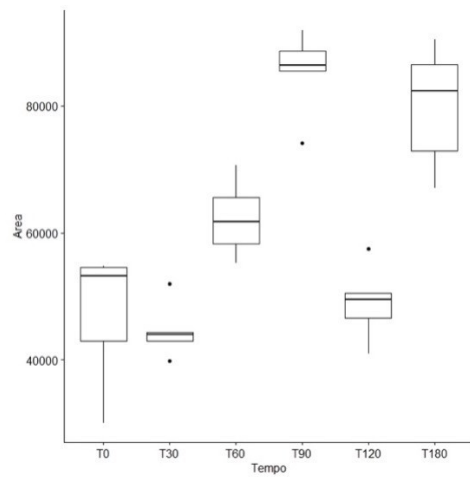


Tabella e Box Plot 6 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swimming uk1 - 22 °C.

4.4.2. Risultati *swarming* 4 °C e 22 °C

Come per il test dello *swimming* sono riportate, nell'allegato 5, la Tabella 30 e la Tabella 31 con le aree ottenute dal test. È importante ricordare che i risultati per lo *swarming* risultano inferiori a quelli dello *swimming* a causa della maggiore percentuale di agar che rende il terreno più denso. Da questi dati è stato possibile costruire il Grafico 18 e il Grafico 19.

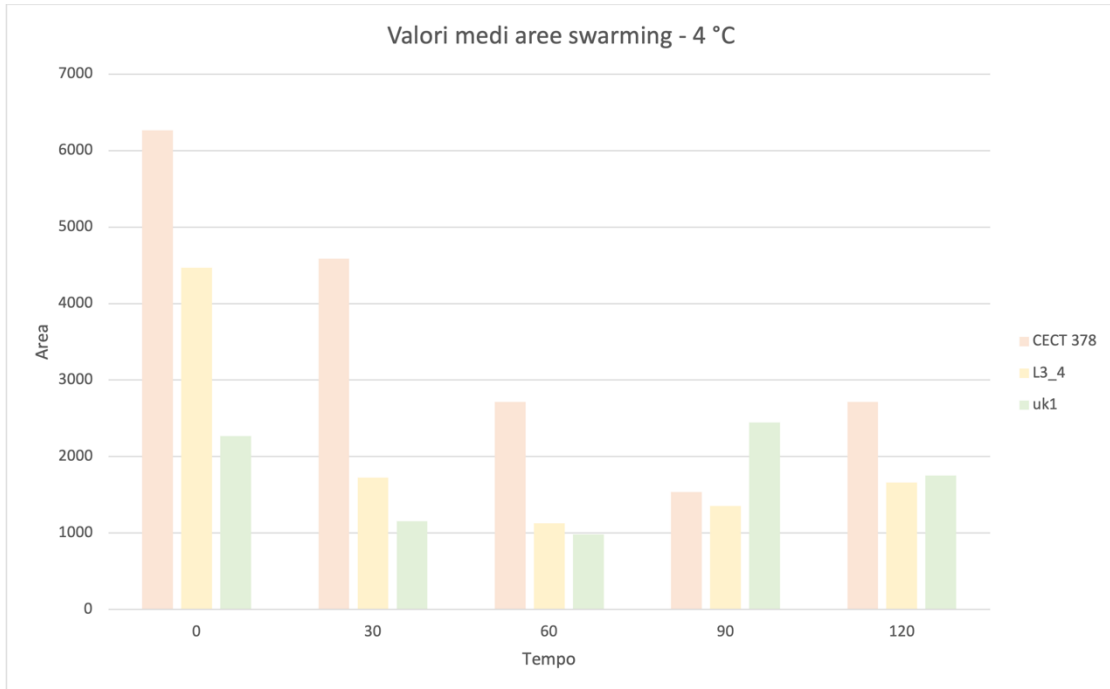


Grafico 18 Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dal test *swarming* a 4 °C.

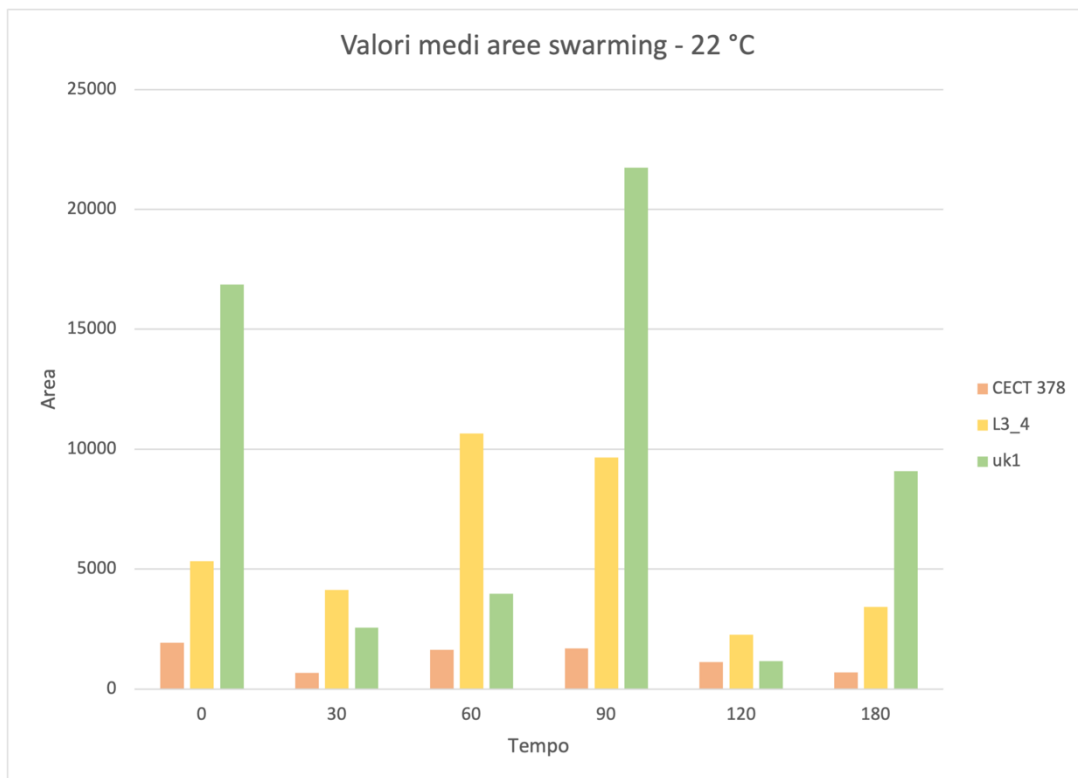


Grafico 19 Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dal test *swarming* a 22 °C.

Dai grafici risulta evidente una maggiore motilità alle temperatura di 22 °C, anche in questo test L3_4 e uk1 sviluppano aree maggiori rispetto a CECT 378. Quest'ultimo, però, ottiene risultati maggiori alle temperature di 4 °C andando a confermare la sua maggiore motilità alle temperature di refrigerazione.

Come per lo swimming è stata svolta un'analisi statistica con il test riportato nel paragrafo 3.7, in materiali e metodi. Lo finalità, anche in questo caso, era il confrontare tra le varie aree ottenuti nei test di *swarming* andando a evidenziare la presenza di cambiamenti significativi nel tempo. Di seguito sono riportati valori di p-value ottenuti (quelli evidenziati in rosso sono significativi) con il relativo box plot prodotto in R-studio.

Valori p-value swarming CECT 378 - 4 °C				
	T0	T120	T30	T60
T120	0,111	-	-	-
T30	0,344	0,026	-	-
T60	0,111	0,548	0,215	-
T90	0,026	0,215	0,026	0,344

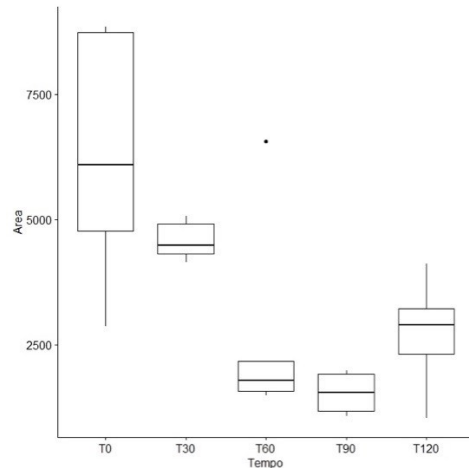


Tabella e Box Plot 7 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swarming CECT 378 - 4 °C.

Valori p-value swarming L3_4 - 4 °C				
	T0	T120	T30	T60
T120	0,77	-	-	-
T30	0,25	1	-	-
T60	0,14	0,11	0,04	-
T90	0,44	0,19	0,04	0,53

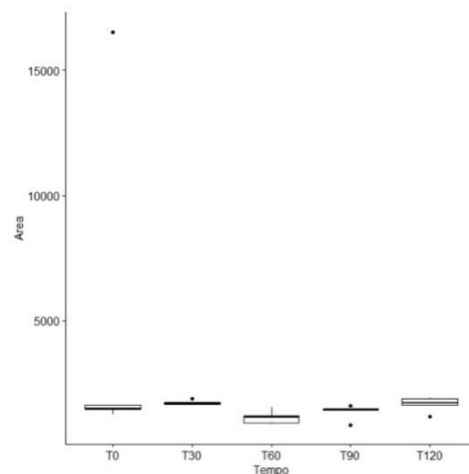


Tabella e Box Plot 8 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swarming L3_4 - 4 °C.

Valori p-value swarming uk1 - 4 °C				
	T0	T120	T30	T60
T120	0,37	-	-	-
T30	0,079	0,667	-	-
T60	0,139	0,37	0,667	-
T90	0,841	0,601	0,079	0,139

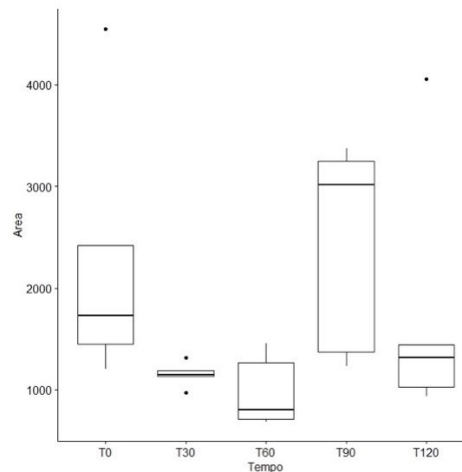


Tabella e Box Plot 9 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swarming uk1 - 4 °C.

Valori p-value swarming CECT 378 - 22 °C					
	T0	T120	T180	T30	T60
T120	0,143	-	-	-	-
T180	0,024	0,03	-	-	-
T30	0,024	0,03	0,807	-	-
T60	0,526	0,093	0,024	0,024	-
T90	0,797	0,303	0,024	0,03	0,841

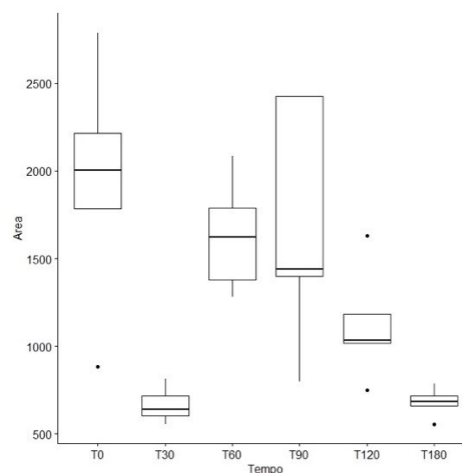


Tabella e Box Plot 10 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swarming CECT 378 - 22 °C.

Valori p-value swarming L3_4 - 22 °C					
	T0	T120	T180	T30	T60
T120	0,048	-	-	-	-
T180	0,422	0,841	-	-	-
T30	0,283	0,048	0,632	-	-
T60	0,139	0,048	0,048	0,048	-
T90	0,632	0,204	0,37	0,422	0,841

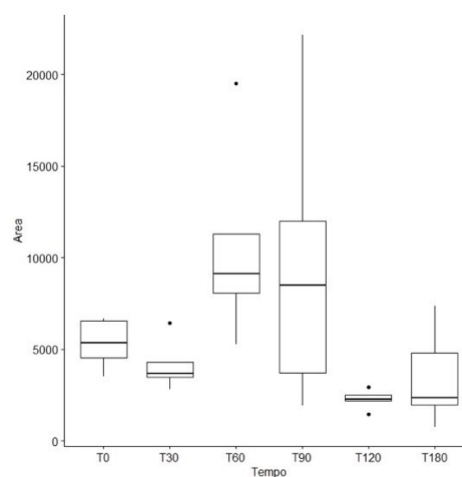


Tabella e Box Plot 11 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swarming L3_4 - 22 °C.

Valori p-value swarming uk1 - 22 °C					
	T0	T120	T180	T30	T60
T120	0,011	-	-	-	-
T180	0,06	0,011	-	-	-
T30	0,011	0,011	0,011	-	-
T60	0,011	0,011	0,011	0,018	-
T90	0,151	0,011	0,018	0,011	0,011

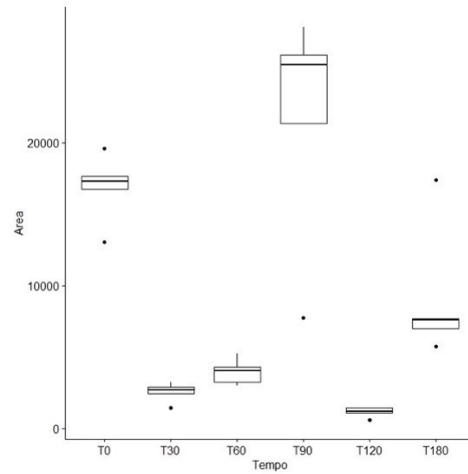


Tabella e Box Plot 12 Valori di p-value ottenuti in seguito all'analisi statistica e box plot relativi al test swarming uk1 - 22 °C.

5. Discussione

Il genere batterico *Pseudomonas* risulta essere molto studiato in quanto centrale sia dal punto di vista sanitario sia all'interno dell'industria alimentare. A causa della sua ubiquitarietà questo batterio è in grado di sopravvivere a condizioni molto varie, con ampio range di temperatura e di pH. La sua centralità nello *spoilage* alimentare, la sua grande resistenza e la sua capacità di attuare forme di persistenza rendono fondamentali ulteriori ricerche al fine di capire i suoi meccanismi per contrastarlo con i migliori mezzi possibili.

Per i motivi sopra elencanti questo progetto si pone l'obiettivo di andare ad ampliare le conoscenze molecolari e fenotipiche della persistenza di *Pseudomonas fluorescens* in condizioni limitanti, nello specifico la crescita per lunghi periodi di tempo in terreni minimi, come simulazione in vitro delle condizioni che si potrebbero creare nell'ambiente delle aziende di produzione degli alimenti.

In particolare, durante l'esperimento sono stati analizzati tre ceppi distinti (CECT 378, L3_4 e uk1) che sono stati osservati e studiati a due differenti temperature di crescita: 22 °C la temperatura ottimale di crescita di *Pseudomonas fluorescens* e 4 °C per simulare la temperatura di refrigerazione. La scelta di questi valori ha lo scopo di simulare le condizioni tipiche di conservazione dei prodotti all'interno della filiera alimentare, con lo scopo di fornire una visione generale dei migliori comportamenti da attuare per limitare la persistenza del batterio stesso.

5.1. La crescita microbica in *long terms cultures*

Per valutare l'andamento dei tre ceppi alle due temperature sono state eseguite delle conte su piastra in terreno PAB/CFC per produrre delle curve di crescita.

Se consideriamo prima i risultati a 22 °C possiamo notare similitudini tra CECT 378 e L3_4, come si può vedere nel Grafico 2 e nel Grafico 4. In particolare, entrambi i ceppi raggiungono il maggior picco al tempo 15 dove si registrano valori di 10-11 log cell/ml. Questo valore massimo viene raggiunto con una rapida crescita tra il tempo 1 e il tempo 3, una fase di plateau tra il tempo 3 e il tempo 7, una nuova fase di crescita fino al tempo 15. In entrambi i casi alcune repliche raggiungono il valore massimo solo al tempo 30. In ogni caso, in seguito al raggiungimento del valore massimo, è presente una diminuzione che però vede una risalita al tempo 120 per L3_4. Il ceppo uk1, invece, sviluppa una curva diversa (Grafico 8): il valore massimo viene raggiunto molto più velocemente, già al tempo 3, ma con un numero di cellule più basso (circa 8 log cell/ml). Inoltre, questo ceppo in seguito presenta valori molto costanti che diminuiscono molto lentamente (fino a circa 7 log cell/ml) man mano che ci si avvicina al tempo 180.

Le curve a 4 °C presentano risultati molto sovrapponibili per le varie repliche di uk1 (Grafico 7), tutte raggiungono il loro punto massimo al tempo 7, in ritardo rispetto ai 22 °C ma con valori superiori (circa 8,5 log cell/ml). Questo rallentamento potrebbe essere dovuto alla temperatura di 4 °C, meno favorevole alla crescita rispetto a quella di 22 °C. Anche in questo caso CECT 378 (Grafico 1) e L3_4 (Grafico 4) arrivano al valore massimo al tempo 15 come per i 22 °C. È interessante notare che nel caso di L3_4 è presente al tempo 3 una diminuzione del numero di cellule seguito da una fase di plateau, fino al tempo 7, che si conclude con la rapida crescita al tempo 15.

In generale tutti e 3 i ceppi, nell'esperimento a 4 °C, al tempo 120 presentano valori uguali o di poco inferiori rispetto allo stesso tempo a 22 °C. Inoltre, se si considera il tempo 180 a 22 °C si vede come i valori minimi raggiunti siano intorno alle 7 log cell/ml, quantità molto elevate se consideriamo i lunghi tempi considerati. Le elevate concentrazioni ottenute in tempi brevi sono associate al breve tempo di replicazione del genere *Pseudomonas*. Questo risulta essere significativamente più breve rispetto ad altri generi batterici, con risultati ottenuti in letteratura che riportano tempi anche inferiori a 2 ore in terreni minimi. (Caldwell & Lawrence, 1986).

Tutto questo ci permette di confermare che *Pseudomonas fluorescens* dimostra una notevole capacità di sopravvivenza per lunghi periodi di tempo in condizioni di stress date dalla mancanza di nutrienti.

Da questi risultati si evidenzia, inoltre, come la temperatura non sembrano influire sulla crescita in modo impattante.

Questa conclusione risulta essere in linea con alcuni risultati presenti in letteratura. In questi viene riportato come le differenti temperature non sembrano avere effetti significativi sulla crescita e sulla vitalità del ceppo CHAO di *Pseudomonas fluorescens* coltivato in un terreno salino in assenza di nutrienti (Arana et al., 2010).

Oltre alle conte microbiche, la valutazione della crescita è stata monitorata anche con la lettura allo spettrofotometro (OD₆₀₀) e con la PCR real-time. I tre metodi possono fornire risultati diversi soprattutto in considerazione che modificazioni morfologiche o di stato cellulare possono modificare le letture spettrofotometriche o la crescita su piastra.

Riguardo la lettura spettrofotometrica, se si considerano i risultati ottenuti a 22 °C (Grafico 11), si vede come le curve ottenute presentino dei picchi massimi intorno al giorno 15 con valori, quindi, sovrapponibili a quelli ottenuti nelle conte. In seguito al tempo 20 è presente una diminuzione che non si verifica per uk1, in questo caso, come detto in precedenza, nei risultati è importante ricordare la produzione di pigmento nero da parte di questo ceppo che va quindi ad alterare i risultati ottenuti nel lungo termine.

I risultati a 4 °C sono, invece, meno interpretabili: questo perché in molti casi le cellule possono cambiare di dimensioni e di forma nel tempo, inoltre si possono formare aggregati cellulari. Tutti questi elementi possono portare a cambiamenti nei valori dell'assorbanza che rendono la lettura allo spettrofotometro un test da associare ad altri elementi. Queste problematiche ci fanno capire come anche le interpretazioni svolte a 22 °C non siano per forza corrette a causa delle molteplici variabili che vanno considerate, e che sia necessario svolgere la conta cellulare per ottenere dei dati più completi e interpretabili.

Nonostante i valori ottenuti a 22 °C, dove la curva prodotta sembra ricordare quella ottenuta dalle conte su piastra, non sempre esiste proporzionalità tra densità cellulare e OD. Questa relazione è valida solo per valori di OD inferiori o uguali a circa 0,4 (Widdel, 2007). I ceppi L3_4 e uk1 superano il valore di 0,4 nelle curve a 22 °C (arrivando quasi a valori pari a 0,6), non garantendo quindi la proporzionalità tra i risultati ottenuti nelle conte e quelli allo spettrofotometro. La lettura con questo strumento è utile come risultato di accompagnamento ai valori

ottenuti in seguito alle conte cellulari o alla real time PCR e non come singolo valore.

Se si considera l'analisi con la real time PCR ci si aspetta di ottenere valori di cellule maggiori a quelli ottenuti all'interno delle conte cellulari. Questo perché grazie a questo metodo è possibile andare a quantificare anche le cellule VBNC che non sono visualizzabili su piastra.

Purtroppo, la metodica con il colorante PMAxx è stata applicata solo a partire dal tempo 120 per l'esperimento a 22 °C (per un problema di disponibilità del reagente in laboratorio), quindi è difficile il confronto con l'esperimento a 4 °C.

In generale si evidenziano dei risultati migliori all'interno dell'esperimento a 4 °C, con la presenza per i 3 ceppi di curve sovrapponibili che vedono nell'andamento della real time PCR un valore di cellule maggiore indicando la frazione di cellule VBNC.

L'aumento delle cellule VBNC nell'esperimento a 4 °C, come si vede dai grafici con i valori medi, sembra avvenire nei tempi 90 e 120. Questo risulta evidente per il ceppo CECT 378 e per uk1, meno per il ceppo L3_4 che presenta invece valori simili tra real time PCR e conte su piastra. Il loro aumento in tempi avanzati evidenzia come le condizioni di stress vadano a favorire la loro presenza (Salive et al., 2020).

Nell'esperimento a 22 °C, invece, si registrano in tutti e 3 i ceppi, in seguito al tempo 120, dei valori ottenuti dalla qPCR inferiori di quelli ottenuti dalle conte. In particolare, questo si verifica al tempo 120 e al tempo 180 nell'esperimento a 22 °C dove i dati ottenuti in seguito alle diluizioni hanno dato spesso valori non contabili o molto elevati rendendo difficile la stima stessa. Questa differenza di valori tra la conta cellulare e l'uso della qPCR risulta causata da una sovrastima nella conta cellulare, considerando la riscontrata affidabilità della qPCR come metodo per il conteggio cellulare (Ilha et al., 2015).

5.2. La capacità di formare biofilm nelle *long term cultures*

La capacità di produrre biofilm è un elemento associato alla persistenza in quanto permette una maggiore resistenza ai trattamenti antibiotici oltre che alle varie forme di stress. La matrice compatta prodotta dalle colonie consente alla comunità batteriche di rimanere adese tra loro e alle superficie, come avviene in molti casi all'interno dei macchinari presenti all'interno dell'industria alimentare. Lo strato che viene generato risulta in molti casi complesso da eliminare consentendo alle stesse comunità di sopravvivere per lunghi periodi.

Visto queste considerazioni si tratta, quindi, di un elemento che è fondamentale andare a valutare in uno studio su colture a lungo termine.

Nell'esperimento riportato in questa tesi non è stata eseguita la valutazione sulla quantità di biofilm realmente depositato nei vari tempi della *long term cultures* (che sarà oggetto di esperimenti futuri), quindi manca il dato della quantità di cellule effettivamente in biofilm e si valuta solamente la capacità di formare biofilm in cellule che sono planctoniche.

Nello specifico è stato eseguito nei vari tempi un test sulla produzione di biofilm, la cui quantità è stata misurata attraverso colorazione con crystal-violetto, come riportato in Materiali e Metodi.

I dati ottenuti, in seguito alla loro elaborazione (Grafico 12, Grafico 13, Grafico 14 e Grafico 15), mostrano come la produzione di biofilm risulti essere un elemento ceppo specifico. In entrambe le temperature si vede che le cellule planctoniche del ceppo CECT 378 producono generalmente meno biofilm: a tutti i tempi presenta valori più bassi e, in particolare, sia a 4° che a 22 °C, i ceppi L3_4 e uk1 mostrano al tempo 0 valori molto elevati rispetto a CECT 378.

Se si svolge un confronto tra i risultati ottenuti a 4 °C e quelli a 22 °C si vede che la capacità di formare biofilm sia più elevata alla temperatura maggiore. Mentre al tempo 0 i valori risultano ancora simili anche se leggermente più elevati a 22 °C, nei tempi successivi la differenza tra le 2 temperature risulta evidente. Questi valori maggiori a 22 °C sembrano indicare che *Pseudomonas* produca biofilm in quantità maggiori alle temperature più ottimali alla sua crescita, rispetto a quelle di refrigerazione.

Questi risultati trovano un riscontro anche nella letteratura, dove viene riportato come valori di temperatura più bassi implicano una minore produzione di biofilm in *S. enterica* (Roy et al., 2021).

Un'ultima interessante considerazione, visibile nei risultati di questo test, è presente al tempo 180 nell'esperimento a 22 °C (Grafico 14). Qui si rileva un aumento della capacità di formare biofilm per tutti e 3 i ceppi, rispetto al tempo 120 e al tempo 90. In particolare, uk1 raggiunge valori molto elevati che sono di poco inferiori di quelli misurati al tempo 0. Una maggiore produzione di biofilm a tempi di coltura così lunghi può essere associata alla stessa persistenza.

5.3. La presenza di *persisters* nelle *long term cultures*

L'utilizzo di un antibiotico al quale il ceppo batterico è sensibile è un metodo efficace per isolare le cellule persistenti. Queste cellule, essendo tolleranti all'antibiotico, sono in grado di sopravvivere e crescere nonostante il trattamento svolto. In particolare, è stato fatto un trattamento con l'antibiotico kanamicina (che era stato precedentemente testato sui tre ceppi per verificare la sensibilità) per andare a evidenziare la presenza di cellule persistenti, come riportato nel paragrafo 3.8 in Materiali e Metodi.

I dati ottenuti, anche se limitati solo al tempo 90 e 120 per i 4 °C e al tempo 180 per i 22 °C, mostrano nella Tabella 8 e nella Tabella 9 la presenza di molte positività.

Sembra che una maggiore presenza di cellule persistenti possa essere ceppo specifica. Infatti, se consideriamo l'esperimento nella sua totalità, si vede come il ceppo CECT 378 risulti essere positivo 14 volte su 15, rispetto alle 4 positività di L3_4 e alle 6 di uk1. Inoltre, se si considerano il numero di cellule presenti si vedono dei valori molti più elevati per CECT 378 rispetto agli altri 2 ceppi, con un numero di colonie spesso non contabili su piastre a causa dell'elevata presenza. Attualmente, però, questa affermazione non trova riscontro nella letteratura.

5.4. La motilità nelle *long term cultures*

I test di motilità hanno lo scopo di stimare la capacità dei batteri di muoversi nel mezzo di coltura. Nel caso specifico, come riportato in Materiali e Metodi, sono stati eseguiti un test di *swimming* in terreno TSA con 0,3% di agar e un test di

swarming sempre in terreno TSA, ma con 0,6% di agar, entrambi sia alla temperatura di 4 °C che a quella di 22 °C.

Dai risultati ottenuti nei test di *swimming* (Grafico 16 e Grafico 17) si vede come la motilità sia ceppo specifica: CECT 378 ottiene valori inferiori rispetto a L3_4 e uk1. Per questi 2 ceppi i valori ottenuti a 22 °C risultano, inoltre, più elevati rispetto a quelli a 4 °C a differenza, invece, di CECT 378. Quest'ultimo presenta una motilità maggiore nel test a 4 °C rispetto che in quello a 22 °C, suggerendo una maggiore motilità alle temperature di refrigerazione.

Questi risultati vengono confermati dal test dello *swarming*: anche in questo caso la motilità risulta maggiore per i ceppi L3_4 e uk1, inoltre si ha CECT 378 che a 4 °C presenta un motilità maggiore rispetto ai 22 °C. Questi risultati confermano le conclusioni riportate sopra.

I valori ottenuti nei test di motilità possono essere confrontati con la produzione di biofilm da parte dei vari ceppi. In particolare, è evidente come i ceppi più mobili, L3_4 e uk1, producano anche maggiori quantità di biofilm. Questo risultato trova un riscontro anche in letteratura, dove si evidenzia come la motilità mediata dal flagello risulti critica nella formazione del biofilm sia in *P. aeruginosa* che in *E. cloacae* (Liaqat et al., 2019; Toole & Kolter, 1998).

6. Prospettive future

In seguito ai risultati ottenuti risulta evidente la grande capacità di questo batterio di resistere a condizioni di stress, nel caso specifico la mancanza di nutrienti, per periodi di tempo molto lunghi. I dati raccolti hanno permesso di capire il comportamento di questo batterio sia alla sua ottimale temperatura di crescita (22 °C) sia alla temperatura di refrigerazione (4 °C). I risultati ottenuti per l'esperimento a 4 °C sono di sicuro interessanti, mostrando come il mantenimento della catena del freddo non impedisca o riduca drasticamente la replicazione del batterio. Per questo è importante evitare contaminazioni di *P. fluorescens* nell'ambiente alimentare.

Rimane ancora molto da studiare per comprendere il fenomeno della persistenza, in particolare capire per quanto tempo le colture possono sopravvivere in queste condizioni. Potrebbe essere utile un ulteriore studio a tempi successivi.

Oltre a questo, un ambito in cui potrebbe essere di sicuro interessante svolgere approfondimenti, è il sequenziamento delle sequenze ottenute dai vari campioni nei vari tempi. Questo permetterebbe di ottenere dei dati aggiuntivi che faciliterebbero i confronti. In modo particolare potrebbe risultare interessante andare a svolgere degli allineamenti tra il tempo 0 e il tempo 180, per esempio, al fine di riuscire a capire che tipo di mutazioni e cambiamenti si verificano tra le colonie originali e le persistenti, ancora presenti, dopo tempi così lunghi. Questo con l'obiettivo di capire come questi ceppi modificano le proprie vie metaboliche per adattarsi e sopravvivere meglio alle condizioni di stress a cui sono esposti.

Queste considerazioni rappresentano dei validi spunti per questo studio e potrebbero contribuire a migliorare e chiarire alcuni aspetti che sono rimasti poco definiti in questo progetto.

Allegato 1

Risultati conte CECT 378 - 4°C																								
Replica	1								2								3							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1		21	2				2,09E+06	6,9		20	1				1,91E+06	6,8		44	3				4,27E+06	6,9
3		n.c.	30				2,73E+07	7,2		142	27				1,54E+07	7,1		161	32				1,75E+07	7,1
7			n.c.	510			4,64E+08	8,9			181	69			2,27E+08	8,6			243	32			2,50E+08	8,1
15				16	0		1,45E+08	7,0				n.c.	392		3,56E+09	7,4				16	1		1,55E+08	7,9
30			128	15			1,30E+08	7,9			164	16			1,64E+08	7,8			161	20			1,65E+08	7,8
60			121	9			1,18E+08	7,9			115	15			1,18E+08	7,9			128	7			1,23E+08	8,1
90		n.c.	132				1,20E+08	8,2		n.c.	68				6,18E+07	8,2		n.c.	134				1,22E+08	8,2
120			139	18			1,64E+07	7,1			5	2			1,82E+06	7,2			139	18			7,27E+06	7,2

Risultati conte CECT 378 - 4°C																
Replica	4								5							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1		31	2				3,00E+06	7,0		25	3				2,55E+06	6,5
3		120	18				1,25E+07	7,1		94	13				9,73E+06	7,1
7			106	7			1,03E+08	8,6			91	9			9,09E+07	8,7
15				9	0		8,18E+07	7,7				520	216		6,69E+09	7,4
30			145	19			1,49E+08	7,7			144	10			1,40E+08	7,8
60			73	9			7,45E+07	8,0			147	20			1,52E+08	8,1
90		n.c.	121				1,10E+08	8,1		n.c.	172				1,56E+08	8,1
120			110	14			1,27E+07	7,0			172	22			2,00E+07	7,0

Tabella 10 Dati relativi alle conte del ceppo CECT 378 a 4 °C, la sigla n.c. si riferisce alla piastre non contabili.

Risultati conte CECT 378 - 22 °C																								
Replica	1								2								3							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1	353	49					3,65E+06	6,6	99	13					1,02E+06	6,0	196	13					1,90E+06	6,3
3			79	14			8,45E+07	7,9			45	9			4,91E+07	7,7			100	13			1,03E+08	8,0
7			116	14			1,18E+08	8,1			98	10			9,82E+07	8,0			157	8			1,50E+08	8,2
15				117	10		1,15E+09	9,1					448	51	4,54E+10	10,7					596	83	6,17E+10	10,8
30					70	9	7,18E+09	9,9					19	9	2,55E+09	9,4					6	1	6,36E+08	8,8
60				n.c.	n.c.		1,00E+08	8,0			310	n.c.			2,82E+08	8,4			165	14			1,63E+08	8,2
90			174	13			1,70E+08	8,2			96	5			9,18E+07	8,0			111	12			1,12E+08	8,0
120		n.c.	42				3,82E+07	7,6		n.c.	94				8,55E+07	7,9		n.c.	68				6,80E+07	7,8
180			15	3			1,64E+07	7,2			19	0			1,73E+07	7,2			7	0			6,36E+06	6,8

Risultati conte CECT 378 - 22 °C																
Replica	4								5							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1	144	11					1,41E+06	6,1	45	8					4,82E+05	5,7
3			131	21			1,38E+08	8,1			82	16			8,91E+07	7,9
7			160	19			1,63E+08	8,2			161	25			1,69E+08	8,2
15					91	3	8,55E+09	9,9					348	54	3,65E+10	10,6
30					8	0	7,27E+08	8,9					20	6	2,36E+09	9,4
60				n.c.	n.c.		1,00E+08	8,0				368	10		3,44E+09	9,5
90			n.c.	n.c.			1,00E+08	8,0			180	32			1,93E+08	8,3
120		n.c.	71				7,10E+07	7,9		n.c.	74				7,40E+07	7,9
180			14	0			1,27E+07	7,1			20	4			2,18E+07	7,3

Tabella 11 Dati relativi alle conte del ceppo CECT 378 a 22, la sigla n.c. si riferisce alla piastre non contabili.

Risultati conte L3_4 - 4 °C																								
Replica	1								2								3							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1		91	15				9,64E+06	7,0			n.c.	260			2,36E+09	9,4			n.c.	250			2,27E+09	9,4
3		354	45				3,63E+07	7,6		314	54				3,35E+07	7,5		290	50				3,09E+07	7,5
7			30	2			2,91E+07	7,5			38	4			3,82E+07	7,6			24	4			2,55E+07	7,4
15				n.c.	1288		1,17E+10	10,1				n.c.	1136		1,03E+10	10,0				n.c.	1200		1,09E+10	10,0
30			161	10			1,55E+08	8,2			155	14			1,54E+08	8,2			142	16			1,44E+08	8,2
60			38	4			3,82E+07	7,6			68	3			6,45E+07	7,8			54	5			5,36E+07	7,7
90		n.c.	150				1,36E+08	8,1		n.c.	62				5,64E+07	7,8		n.c.	80				7,27E+07	7,9
120			294	58			3,20E+08	8,5			222	78			5,27E+07	7,7			191	27			7,09E+07	7,9

Risultati conte L3_4 - 4 °C																
Replica	4								5							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1			n.c.	172			1,56E+09	9,2			n.c.	360			3,27E+09	9,5
3		214	91				2,77E+07	7,4		500	93				5,39E+07	7,7
7			15	2			1,55E+07	7,2			23	4			2,45E+07	7,4
15				n.c.	680		6,18E+09	9,8				n.c.	652		5,93E+09	9,9
30			201	21			2,02E+08	8,3			146	18			1,49E+08	8,2
60			160	13			1,57E+08	8,2			120	20			1,27E+08	7,9
90		n.c.	143				1,30E+08	8,1		n.c.	72				6,55E+07	7,9
120			110	25			2,45E+07	7,4			102	24			2,18E+07	7,8

Tabella 12 Dati relativi alle conte del ceppo L3_4 a 4 °C, la sigla n.c. si riferisce alla piastre non contabili.

Risultati conte L3_4 - 22 °C																								
Replica	1								2								3							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1	340	96					3,96E+06	6,6	340	70					3,73E+06	6,6	720	96					7,42E+06	6,9
3			164	16			1,64E+08	8,2			145	33			1,62E+08	8,2			194	25			1,99E+08	8,3
7			143	26			1,54E+08	8,2			113	8			1,10E+08	8,0			148	16			1,49E+08	8,2
15				32	2		3,09E+08	8,5				21	2		2,09E+08	8,3					352	71	3,85E+10	10,6
30					52	2	4,91E+09	9,7					87	6	8,45E+09	9,9					16	4	1,82E+09	9,3
60			44	5			4,45E+07	7,6			54	4			5,27E+07	7,7			35	4			3,55E+07	7,5
90			77	11			8,00E+07	7,9			64	4			6,18E+07	7,8			48	5			4,82E+07	7,7
120		n.c.	396				3,60E+08	8,6		n.c.	496				4,51E+08	8,7		n.c.	636				6,36E+08	8,8
180			n.c.	n.c.			1,00E+08	8,0			440	124			5,13E+08	8,7			272	58			3,00E+08	8,5

Risultati conte L3_4 - 22 °C																
Replica	4								5							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1	640	82					6,56E+06	6,8	724	114					7,62E+06	6,9
3			71	21			8,36E+07	7,9			85	15			9,09E+07	8,0
7			162	91			2,30E+08	8,4			63	8			6,45E+07	7,8
15					840	110	8,64E+10	10,9					244	26	2,45E+10	10,4
30					11	3	1,27E+09	9,1					14	1	1,36E+09	9,1
60			28	3			2,82E+07	7,4			42	6			4,36E+07	7,6
90			46	7			4,82E+07	7,7			43	3			4,18E+07	7,6
120		n.c.	350				3,50E+08	8,5		n.c.	524				5,24E+08	8,7
180			18	0			1,64E+07	7,2			32	3			3,18E+07	7,5

Tabella 13 Dati relativi alle conte del ceppo L3_4 a 22 °C, la sigla n.c. si riferisce alla piastre non contabili.

Risultati conte uk1 - 4 °C																								
Replica	1								2								3							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1		64	14				7,09E+06	6,9		63	9				6,55E+06	6,8		67	16				7,55E+06	6,9
3		172	14				1,69E+07	7,2		117	10				1,15E+07	7,1		122	14				1,24E+07	7,1
7			488	400			8,07E+08	8,9			274	148			3,84E+08	8,6			113	27			1,27E+08	8,1
15				1	0		9,09E+06	7,0				2	1		2,73E+07	7,4				5	4		8,18E+07	7,9
30			77	4			7,36E+07	7,9			58	4			5,64E+07	7,8			60	9			6,27E+07	7,8
60			80	11			8,27E+07	7,9			74	11			7,73E+07	7,9			116	13			1,17E+08	8,1
90		n.c.	165				1,50E+08	8,2		n.c.	187				1,70E+08	8,2		n.c.	181				1,65E+08	8,2
120			62	14			1,27E+07	7,1			154	19			1,73E+07	7,2			93	19			1,73E+07	7,0

Risultati conte uk1 - 4 °C																
Replica	4								5							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1		88	11				9,00E+06	7,0		31	5				3,27E+06	6,5
3		119	10				1,17E+07	7,1		117	8				1,14E+07	7,1
7			n.c.	396			3,60E+08	8,6			298	250			4,98E+08	8,6
15				3	2		4,55E+07	7,7				2	1		2,73E+07	7,5
30			50	7			5,18E+07	7,7			61	7			6,18E+07	7,8
60			101	8			9,91E+07	8,0			125	11			1,24E+08	8,0
90		n.c.	152				1,38E+08	8,1		n.c.	153				1,39E+08	8,2
120			136	10			9,09E+06	7,0			105	11			1,00E+07	7,1

Tabella 14 Dati relativi alle conte del ceppo uk1 a 4 °C, la sigla n.c. si riferisce alla piastre non contabili.

Risultati conte uk1 - 22 °C																								
Replica	1								2								3							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1	184	18					1,84E+06	6,3	111	32					1,30E+06	6,1	9 7	9					9,64E+05	6,0
3			83	10			8,45E+07	7,9			134	17			1,37E+08	8,1			67	12			7,18E+07	7,9
7			103	11			1,04E+08	8,0			146	21			1,52E+08	8,2			166	24			1,73E+08	8,2
15				23	3		2,36E+08	8,4				20	3		2,09E+08	8,3				36	2		3,45E+08	8,5
30				21	1		2,00E+08	8,3				27	0		2,45E+08	8,4				18	1		1,73E+09	8,2
60			158	95			2,30E+80	8,4			54	9			5,73E+07	7,8			126	8			1,22E+08	8,1
90			27	3			2,73E+07	7,4			29	2			2,82E+07	7,4			37	1			3,45E+07	7,5
120		146	9				1,41E+07	7,1		139	23				1,47E+07	7,2		119	16				1,23E+07	7,1
180			4	1			4,55E+06	6,7			2	1			2,73E+06	6,4			9	3			1,09E+07	7,0

Risultati conte uk1 - 22 °C																
Replica	4								5							
Tempo	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG	-3	-4	-5	-6	-7	-8	Conta	LOG
1	104	81					1,68E+06	6,2	113	18					1,19E+06	6,1
3			83	16			9,00E+07	8,0			96	11			9,73E+07	8,0
7			145	18			1,48E+08	8,2			128	11			1,26E+08	8,1
15				22	1		2,09E+08	8,3				21	5		2,36E+08	8,4
30				20	1		1,91E+08	8,3				6	2		7,27E+07	7,9
60			174	49			2,03E+08	8,3			n.c.	146			1,33E+09	9,1
90			29	6			3,18E+07	7,5			42	7			4,45E+07	7,6
120		115	32				1,34E+07	7,1		142	26				1,53E+07	7,2
180			50	0			4,55E+07	7,1			13	1			1,27E+07	7,1

Tabella 15 Dati relativi alle conte del ceppo uk1 a 22 °C, la sigla n.c. si riferisce alla piastre non contabili

Allegato 2

Letture OD ₆₀₀ CECT 378 - 4 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	0,0000	0,0000	0,0040	0,0019	0,0031	0,0018	0,0018
7	0,0522	0,0572	0,0496	0,0399	0,0489	0,0496	0,0063
15	0,0593	0,0665	0,0692	0,0575	0,0600	0,0625	0,0051
20	0,0731	0,0876	0,0812	0,0740	0,0832	0,0799	0,0062
30	0,1201	0,1166	0,1010	0,1134	0,1060	0,1115	0,0078
60	0,1328	0,1135	0,1122	0,1090	0,1270	0,1189	0,0104
90	0,2234	0,2300	0,1707	0,1673	0,1947	0,1972	0,0290
120	0,2854	0,2702	0,2464	0,2511	0,2831	0,2673	0,0179

Tabella 16 Risultati delle letture a OD₆₀₀ per il ceppo CECT 378 a 4 °C. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard ottenuti dai dati misurati

Letture OD ₆₀₀ L3_4 - 4 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	0,0021	0,0043	0,0090	0,0092	0,0051	0,0059	0,0031
7	0,0604	0,0838	0,0617	0,0503	0,0495	0,0611	0,0139
15	0,1830	0,2034	0,1761	0,1899	0,1839	0,1873	0,0103
20	0,1898	0,1211	0,1593	0,2395	0,2002	0,1820	0,0445
30	0,2523	0,2870	0,2878	0,3035	0,2693	0,2800	0,0196
60	0,2457	0,2566	0,2555	0,3311	0,2815	0,2741	0,0345
90	0,2892	0,2597	0,2645	0,3405	0,2621	0,2832	0,0342
120	0,2491	0,2607	0,2811	0,3641	0,2934	0,2897	0,0450

Tabella 17 Risultati delle letture a OD₆₀₀ per il ceppo L3_4 a 4 °C. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard ottenuti dai dati misurati

Letture OD ₆₀₀ uk1 - 4 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0004	0,0008
7	0,0251	0,0296	0,0284	0,0264	0,0304	0,0280	0,0022
15	0,0705	0,0712	0,0796	0,0596	0,0589	0,0680	0,0087
20	0,0809	0,0881	0,0857	0,0787	0,0869	0,0841	0,0041
30	0,1149	0,1215	0,1213	0,1152	0,0975	0,1141	0,0098
60	0,1640	0,1606	0,1827	0,1613	0,1625	0,1663	0,0093
90	0,2326	0,2374	0,2650	0,2343	0,2250	0,2388	0,0153
120	0,3422	0,2999	0,3358	0,3190	0,3021	0,3198	0,0192

Tabella 18 Risultati delle letture a OD₆₀₀ per il ceppo uk1 a 4 °C. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard ottenuti dai dati misurati

Letture OD₆₀₀ CECT 378 – 22°C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	0,0107	0,0175	0,0084	0,0097	0,0097	0,0112	0,0036
3	0,0658	0,0689	0,0941	0,0883	0,0926	0,0819	0,0135
6	0,1252	0,1116	0,1339	0,1399	0,1499	0,1321	0,0146
9	0,2305	0,2377	0,2366	0,2100	0,2156	0,2260	0,0126
15	0,3143	0,3211	0,3255	0,3580	0,3272	0,3292	0,0168
20	0,3101	0,3236	0,3282	0,3102	0,3266	0,3198	0,0089
30	0,2521	0,2826	0,2438	0,2332	0,2569	0,2537	0,0185
60	0,1577	0,1614	0,1649	0,1501	0,1528	0,1574	0,0061
90	0,1216	0,1402	0,1212	0,1205	0,1164	0,1240	0,0093
120	0,0805	0,0909	0,0783	0,0765	0,0792	0,0810	0,0057
180	0,1173	0,1155	0,1159	0,1099	0,1163	0,1150	0,0029

Tabella 19 Risultati delle letture a OD₆₀₀ per il ceppo CECT 378 a 22 °C. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard ottenuti dai dati misurati.

Letture OD₆₀₀ L3_4 - 22 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	0,0178	0,0156	0,0137	0,0180	0,0161	0,0162	0,0018
3	0,0984	0,1318	0,1211	0,1243	0,1064	0,1164	0,0137
6	0,1437	0,1184	0,1628	0,1696	0,0907	0,1370	0,0326
9	0,2976	0,2607	0,2544	0,2756	0,2260	0,2628	0,0265
15	0,5109	0,5041	0,5403	0,4809	0,4388	0,4950	0,0379
20	0,2961	0,3255	0,3394	0,3413	0,3264	0,3258	0,0181
30	0,2513	0,2673	0,2805	0,2752	0,2752	0,2699	0,0114
60	0,1639	0,1644	0,1877	0,1755	0,1584	0,1700	0,0117
90	0,1051	0,1001	0,1057	0,1089	0,0937	0,1027	0,0059
120	0,0597	0,0434	0,0539	0,0556	0,0313	0,0487	0,0115
180	0,0809	0,0706	0,0811	0,0920	0,0751	0,0800	0,0080

Tabella 20 Risultati delle letture a OD₆₀₀ per il ceppo L3_4 a 22 °C. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard ottenuti dai dati misurati.

Lettura OD ₆₀₀ uk1 - 22 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	0,0184	0,0123	0,0155	0,0194	0,0136	0,0158	0,0030
3	0,1360	0,1233	0,1391	0,1192	0,1447	0,1324	0,0108
6	0,1505	0,1567	0,1791	0,1827	0,2195	0,1777	0,0272
9	0,2821	0,2254	0,2369	0,2834	0,3043	0,2664	0,0336
15	0,3543	0,3209	0,3279	0,3461	0,3541	0,3406	0,0154
20	0,5131	0,5267	0,5835	0,5367	0,5459	0,5412	0,0266
30	0,5063	0,4977	0,5285	0,4892	0,4944	0,5032	0,0154
60	0,4416	0,4888	0,4888	0,4567	0,4780	0,4708	0,0209
90	0,4477	0,4360	0,4375	0,4173	0,4302	0,4338	0,0111
120	0,4308	0,3867	0,4259	0,3966	0,4158	0,4111	0,0189
180	0,4443	0,4382	0,4375	0,3149	0,4367	0,4144	0,0557

Tabella 21 Risultati delle letture a OD₆₀₀ per il ceppo uk1 a 22 °C. Sono riportati i valori medi e la deviazione standard ottenuti dai dati misurati.

Allegato 3

Valori Real Time PCR CECT 378 - 4 °C				
Tempo	Media CFU	Media qPCR	Dev. St. CFU	Dev. St. qPCR
1	6,42	7,37	0,139	0,294
15	8,73	8,67	0,889	0,529
20	7,98	8,55	0,048	0,540
30	8,17	9,04	0,044	0,352
60	8,06	8,45	0,113	0,329
90	8,04	9,39	0,149	0,642

Valori Real Time PCR CECT 378 - 22 °C				
Tempo	Media CFU	Media qPCR	Dev. St. CFU	Dev. St. qPCR
3	9,50	7,94	0,164	0,253
15	10,20	10,20	0,717	0,366
20	9,54	10,38	0,928	0,415
90	9,52	8,13	0,131	0,470
120	7,62	7,61	0,023	0,418
180	7,13	7,14	0,205	0,451

Valori Real Time PCR L3_4 - 4 °C				
Tempo	Media CFU	Media qPCR	Dev. St. CFU	Dev. St. qPCR
1	8,88	7,75	1,069	0,330
15	9,94	8,75	0,143	0,403
20	9,52	8,31	1,512	0,547
30	8,20	8,93	0,059	0,641
60	7,88	9,07	0,258	0,760
90	7,94	7,74	0,177	0,617
120	7,81	7,51	0,430	0,309

Valori Real Time PCR L3_4 - 22 °C				
Tempo	Media CFU	Media qPCR	Dev. St. CFU	Dev. St. qPCR
3	8,12	9,60	0,169	0,273
15	9,74	9,75	1,239	0,506
20	9,52	9,78	0,383	0,416
90	7,74	9,71	0,112	0,554
120	8,66	7,43	0,110	0,197
180	7,98	6,65	0,631	0,168

Valori Real Time PCR uk1 - 4 °C				
Tempo	Media CFU	Media qPCR	Dev. St. CFU	Dev. St. qPCR
1	6,80	6,41	0,169	0,277
15	7,48	8,62	0,352	0,504
20	6,29	8,35	0,227	0,303
30	7,78	8,85	0,057	0,479
60	7,99	8,18	0,090	0,744
90	8,18	8,54	0,041	0,486
120	7,11	8,18	0,130	0,626

Valori Real Time PCR uk1 - 22 °C				
Tempo	Media CFU	Media qPCR	Dev. St. CFU	Dev. St. qPCR
3	7,97	9,12	0,104	0,295
15	8,39	9,76	0,090	0,366
20	8,47	9,75	0,207	0,417
90	7,52	9,61	0,085	0,342
120	7,14	6,38	0,037	0,259
180	6,98	6,65	0,469	0,611

Gruppo di tabelle 3 Logaritmo in base 10 dei valori medi ottenuti in seguito alla conta su piastra e alla Real time PCR con relative deviazione standard per i 3 ceppi ad entrambe le temperature.

Allegato 4

Test biofilm CECT 378 - 4 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	1,1847	1,7178	1,4264	3,2517	2,1072	1,9375	0,8112
30	1,1674	1,2522	1,1386	1,6699	1,9439	1,4344	0,3560
60	2,4488	1,8678	1,4664	1,3759	1,6151	1,7548	0,4303
90	5,6554	1,5419	5,8480	4,3265	3,5548	4,1853	1,7558
120	2,1133	0,6476	1,5710	1,5576	1,3367	1,4453	0,5298

Tabella 22 Valori ottenuti nelle 5 repliche del test biofilm per CECT 378 a 4 °C.

Test biofilm L3_4 - 4 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	1,8297	596,4027	951,4147	2,8268	3,3112	311,1570	440,6855
30	3,0715	2,8426	3,3034	3,4930	4,6379	3,4697	0,6973
60	15,6362	16,6810	11,0621	8,6662	14,2125	13,2516	3,3238
90	9,5806	6,3919	4,5650	3,4444	5,1607	5,8285	2,3517
120	1,8803	1,1688	1,1876	0,7610	0,8348	1,1665	0,4429

Tabella 23 Valori ottenuti nelle 5 repliche del test biofilm per L3_4 a 4 °C.

Test biofilm uk1 - 4 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	183,8562	612,6301	213,9153	136,8154	4,9494	230,4333	228,1030
30	0,8908	0,8455	1,2341	0,5176	1,1398	0,9256	0,2807
60	4,2949	3,6795	2,4961	2,3048	2,6196	3,0790	0,8645
90	18,4007	14,3652	7,3081	8,6723	10,5063	11,8505	4,5213
120	2,3492	2,5408	2,3559	3,1366	3,6120	2,7989	0,5568

Tabella 24 Valori ottenuti nelle 5 repliche del test biofilm per uk1 a 4 °C.

Test biofilm CECT 378 - 22 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	1,9877	2,7483	3,2420	2,2767	2,1471	2,4804	0,5117
30	8,4519	8,8596	9,9223	5,9866	5,5482	7,7537	1,8974
60	5,3259	5,7343	8,9016	8,8507	11,0416	7,9708	2,4015
90	9,0829	12,1318	10,2957	9,8241	11,9089	10,6487	1,3270
120	1,6845	2,1136	1,7741	1,8111	1,8744	1,8515	0,1618
180	15,4938	22,4129	7,5273	21,8891	21,7409	17,8128	18,2766

Tabella 25 Valori ottenuti nelle 5 repliche del test biofilm per CECT 378 a 22 °C.

Test biofilm L3_4 - 22 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	46,9805	756,5853	737,3861	56,9265	67,1027	332,9962	378,0469
30	23,1474	21,3078	24,1747	28,7610	22,7709	24,0324	2,8363
60	55,5254	37,2983	46,6907	52,6969	84,0092	55,2441	17,5300
90	13,7435	13,6933	16,9922	20,8281	3,8340	13,8182	6,3031
120	4,7403	4,1687	2,8577	2,2366	3,3867	3,4780	1,0006
180	8,0976	44,5955	26,3227	22,6424	25,7729	25,4862	13,0038

Tabella 26 Valori ottenuti nelle 5 repliche del test biofilm per L3_4 a 22 °C.

Test biofilm uk1 - 22 °C							
Tempo	1	2	3	4	5	Media	Dev. St.
0	143,8160	458,8823	308,2371	306,3595	100,7549	263,6099	143,8947
30	5,3630	9,5743	11,6697	5,4253	9,5739	8,3212	2,8057
60	4,5416	4,6983	5,5585	5,6863	5,9634	5,2896	0,6310
90	4,4677	7,7528	6,8544	6,6355	3,6800	5,8781	1,7220
120	0,7728	2,2737	2,0979	1,3955	1,5890	1,6258	0,5968
180	366,7691	189,0749	571,0240	23,2521	129,8708	255,9982	215,6786

Tabella 27 Valori ottenuti nelle 5 repliche del test biofilm per uk1 a 22 °C.

Allegato 5

Valori medi aree swimming 4 °C			
Tempo	CECT 378	L3_4	uk1
0	2749,267	9093,2	75841
30	33865,33	12842,07	40863,87
60	7796	5079	54910,53
90	36546,6	33648,13	68942,73
120	42710,73	41520,07	92275,73

Tabella 28 Valori medi test swimming a 4 °C.

Valori medi aree swimming 22 °C			
Tempo	CECT 378	L3_4	uk1
0	4484,2	38645,8	47104,93
30	2329,667	46635,6	44617,4
60	7545,133	19113,43	62275,87
90	6587,933	51821,47	85296,4
120	2029,667	53238,93	48984,07
180	1537,933	68981,27	79840,33

Tabella 29 Valori medi test swimming a 22 °C.

Valori medi aree swimming 4 °C			
Tempo	CECT 378	L3_4	uk1
0	2749,267	9093,2	75841
30	33865,33	12842,07	40863,87
60	7796	5079	54910,53
90	36546,6	33648,13	68942,73
120	42710,73	41520,07	92275,73

Tabella 30 Valori medi test swarming a 4 °C.

Valori medi aree swimming 22 °C			
Tempo	CECT 378	L3_4	uk1
0	4484,2	38645,8	47104,93
30	2329,667	46635,6	44617,4
60	7545,133	19113,43	62275,87
90	6587,933	51821,47	85296,4
120	2029,667	53238,93	48984,07
180	1537,933	68981,27	79840,33

Tabella 31 Valori medi test swarming a 22 °C.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la professoressa Barbara Cardazzo per avermi permesso di svolgere questa esperienza di tirocinio e la relativa tesi.

Voglio anche ringraziare Lisa e Hooriyeh per gli insegnamenti datomi in laboratorio e per il tempo dedicatomi durante la stesura della tesi, dimostrando sempre la grande disponibilità.

Una grande ringraziamento va alla mia famiglia che mi ha sempre supportato nel mio percorso in tutti questi anni di studio.

Il grazie più grande va a Petra che negli ultimi 9 anni mi ha sempre aiutato, condividendo con me i momenti di gioia ma anche quelli meno felici (soprattutto quando doveva sopportarmi finché ripetevo prima degli esami).

Infine, voglio ringraziare Sofia che nonostante un solo anno da colleghi è rimasta una grande amica e Rachele che è diventata un'amica speciale dopo la laurea triennale insieme.

Bibliografia

- Aiyer, K. S., Vijayakumar, B. S., & Vishwanathan, A. S. (2018). The Enigma of Biofilms. *Current Science*, 115(2), 204. <https://doi.org/10.18520/cs/v115/i2/204-205>
- Anderson, B. W., Fung, D. K., & Wang, J. D. (2021). Regulatory Themes and Variations by the Stress-Signaling Nucleotide Alarmones (p)ppGpp in Bacteria. *Annual review of genetics*, 55, 115–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021821-025827>
- Andreani, N. A. (2015). *INTO THE BLUE: Spoilage phenotypes of Pseudomonas fluorescens in food matrices* [PhD Thesis INTO THE BLUE: Spoilage phenotypes of Pseudomonas fluorescens in food matrices].
- Andreani, N. A., Carraro, L., Zhang, L., Vos, M., & Cardazzo, B. (2019). Transposon mutagenesis in Pseudomonas fluorescens reveals genes involved in blue pigment production and antioxidant protection. *Food microbiology*, 82, 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.028>
- Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Bordin, P., & Cardazzo, B. (2014). Tracking the blue: a MLST approach to characterise the Pseudomonas fluorescens group. *Food microbiology*, 39, 116–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.012>
- Arana, I., Muela, A., Orruño, M., Seco, C., Garaizabal, I., & Barcina, I. (2010). Effect of temperature and starvation upon survival strategies of Pseudomonas fluorescens CHA0: comparison with Escherichia coli. *FEMS microbiology ecology*, 74(3), 500–509. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00979.x>
- Arunasri, K., Adil, M., Khan, P. A., & Shivaji, S. (2014). Global gene expression analysis of long-term stationary phase effects in E. coli K12 MG1655. *PloS one*, 9(5), e96701. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096701>
- Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the Viable but Nonculturable State and Antibiotic Persister Cells. *Journal of bacteriology*, 200(20), e00249-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Brynildsen, M. P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J. J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J. M., Hardt, W. D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D. T., Jenal, U., Levin, B. R., Michiels, J., ... Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature reviews. Microbiology*, 17(7), 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2016). *The Microbiological Quality of Food : Foodborne Spoilers*. Elsevier Science.
- Bondi, M., Messi, P., Halami, P. M., Papadopoulou, C., & de Niederhausern, S. (2014). Emerging microbial concerns in food safety and new control measures. *BioMed research international*, 2014, 251512. <https://doi.org/10.1155/2014/251512>

- Caldwell, D. E., & Lawrence, J. R. (1986). Growth kinetics of *Pseudomonas fluorescens* microcolonies within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microbial ecology*, 12(3), 299–312. <https://doi.org/10.1007/BF02011173>
- Camilli, A., & Bassler, B. L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5764), 1113–1116. <https://doi.org/10.1126/science.1121357>
- Caputo, L., Quintieri, L., Bianchi, D. M., Decastelli, L., Monaci, L., Visconti, A., & Baruzzi, F. (2015). Pepsin-digested bovine lactoferrin prevents Mozzarella cheese blue discoloration caused by *Pseudomonas fluorescens*. *Food microbiology*, 46, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.021>
- Cichello S. A. (2015). Oxygen absorbers in food preservation: a review. *Journal of food science and technology*, 52(4), 1889–1895. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1265-2>
- Dalebroux, Z. D., & Swanson, M. S. (2012). ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature reviews. Microbiology*, 10(3), 203–212. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2720>
- David Hendricks Bergey, Holt, J. G., Murray, R. G. E., Krieg, N. R., & Al, E. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology / Vol. 1 / Noel R. Krieg, ed. ; ed. in chief: John G. Holt ; ed. board R.G.E. Murray ... [et al.] ; with contrib. from 124 colleagues*. Williams & Wilkins, Cop.
- Deter, H. S., Jensen, R. V., Mather, W. H., & Butzin, N. C. (2017). Mechanisms for Differential Protein Production in Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins*, 9(7), 211. <https://doi.org/10.3390/toxins9070211>
- Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature reviews. Microbiology*, 15(8), 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Genus: *Pseudomonas*. (n.d.). www.bacterio.net. <https://www.bacterio.net/genus/pseudomonas>
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79–97. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00233-7)
- Hilario, E., Buckley, T. R., & Young, J. M. (2004). Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of atp D, car A, rec A and 16S rDNA. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 51–64. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024910.57117.16>
- Huis in 't Veld J. H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International journal of food microbiology*, 33(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)

- Ilha, E. C., Scariot, M. C., Treml, D., Pereira, T. P., Sant'Anna, E. S., Prudêncio, E. S., & Arisi, A. C. M. (2015). Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. *Annals of Microbiology*, *66*(2), 597–606. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1137-7>
- İzgördü, Ö. K., Darcan, C., & Kariptaş, E. (2022). Overview of VBNC, a survival strategy for microorganisms. *3 Biotech*, *12*(11), 307. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03371-4>
- Jurėnas, D., Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2022). Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nature reviews. Microbiology*, *20*(6), 335–350. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>
- Klein, S., Lorenzo, C., Hoffmann, S., Walther, J. M., Storbeck, S., Piekarski, T., Tindall, B. J., Wray, V., Nimtz, M., & Moser, J. (2009). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Molecular microbiology*, *71*(3), 551–565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x>
- Korch, S. B., Henderson, T. A., & Hill, T. M. (2003). Characterization of the hipA7 allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Molecular Microbiology*, *50*(4), 1199–1213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x>
- Kumar, H., Franzetti, L., Kaushal, A., & Kumar, D. (2019). *Pseudomonas fluorescens*: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology*, *69*(9), 873–883. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7>
- Liaqat, I., Liaqat, M., Tahir, H. M., Haq, I., Ali, N. M., Arshad, M., & Arshad, N. (2019). Motility effects biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, *32*(3), 927–932.
- Lewis K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry. Biokhimiia*, *70*(2), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6>
- Longo, M. C., Berninger, M. S., & Hartley, J. L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, *93*(1), 125–128. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90145-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90145-h)
- López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(7), a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>
- Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, *157*(3), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>
- Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W., & Griffiths, M. W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in Fluid Milk Products: A Review. *Journal of food protection*, *54*(12), 969–979. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.12.969>

- Meyer, J. M., & Abdallah, M. A. (1978). The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology*, *107*(2), 319–328. <https://doi.org/10.1099/00221287-107-2-319>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature reviews. Microbiology*, *17*(6), 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental microbiology*, *12*(6), 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, *30*(2), 295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature chemical biology*, *12*(4), 208–214. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>
- Palleroni N. J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental microbiology*, *12*(6), 1377–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *9*(6), 1132–1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *57*, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Pletnev, P., Osterman, I., Sergiev, P., Bogdanov, A., & Dontsova, O. (2015). Survival Guide: *Escherichia coli* in the Stationary Phase. *Acta Naturae*, *7*(4), 22–33. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-4-22-33>
- Rajmohan, S., Dodd, C. E., & Waites, W. M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of applied microbiology*, *93*(2), 205–213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01674.x>
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, *2015*(54), 47–56. <https://www.imedpub.com/articles/food-spoilage-microorganisms-and-their-prevention.pdf>

- Roy, P. K., Ha, A. J., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., Ashrafudoulla, M., Toushik, S. H., Nahar, S., Kim, Y. K., & Ha, S. D. (2021). Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry science*, *100*(7), 101209. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101209>
- Salive, A. F. V., Prudêncio, C. V., Baglinière, F., Oliveira, L. L., Ferreira, S. O., & Vanetti, M. C. D. (2020). Comparison of stress conditions to induce viable but non-cultivable state in *Salmonella*. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *51*(3), 1269–1277. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00261-w>
- Samarzija D., Šimun Z., Pogacic T.. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarstvo / Dairy*. 62. 77-95.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, *35*(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Srivatsan, A., & Wang, J. D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Current opinion in microbiology*, *11*(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.001>
- Sugisaki K., Hanawa, T., Yonezawa, H., Osaki, T., Fukutomi, T., Kawakami, H., Yamamoto, T., & Kamiya, S. (2013). Role of (p)ppGpp in biofilm formation and expression of filamentous structures in *Bordetella pertussis*. *Microbiology*, *159*(Pt_7), 1379–1389. <https://doi.org/10.1099/mic.0.066597-0>
- taxonomy. (2014). *Taxonomy browser (Pseudomonas)*. Nih.gov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=286>
- Tian, C., Roghanian, M., Jørgensen, M. G., Sneppen, K., Sørensen, M. A., Gerdes, K., & Mitarai, N. (2016). Rapid Curtailing of the Stringent Response by Toxin-Antitoxin Module-Encoded mRNases. *Journal of bacteriology*, *198*(14), 1918–1926. <https://doi.org/10.1128/JB.00062-16>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International journal of molecular sciences*, *21*(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Travis, B. A., & Schumacher, M. A. (2022). Diverse molecular mechanisms of transcription regulation by the bacterial alarmone ppGpp. *Molecular microbiology*, *117*(2), 252–260. <https://doi.org/10.1111/mmi.14860>
- Van den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS microbiology reviews*, *41*(3), 219–251. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>

- Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Susilowati, H., Kayama, S., Hirota, K., & Miyake, Y. (2006). Functional analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiology and immunology*, *50*(4), 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x>
- Widdel, F. (2007). Theory and Measurement of Bacterial Growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie*.
- Wilmaerts, D., Windels, E. M., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2019). General Mechanisms Leading to Persister Formation and Awakening. *Trends in genetics : TIG*, *35*(6), 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.03.007>
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Weisburg, W. G., Paster, B. J., Madigan, M. T., Fowler, V. J., Hahn, C. M., Blanz, P., Gupta, R., Nealson, K. H., & Fox, G. E. (1984). The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and applied microbiology*, *5*, 315–326. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(84\)80034-x](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(84)80034-x)
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A., & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology (Reading, England)*, *146* (Pt 10), 2385–2394. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2385>
- Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial ecology*, *8*(4), 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02010671>
- Zou, J., Peng, B., Qu, J., & Zheng, J. (2022). Are Bacterial Persisters Dormant Cells Only?. *Frontiers in microbiology*, *12*, 708580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708580>