

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata E Alimentazione

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

Valutazione del potenziale alterante di ceppi di

Pseudomonas fluorescens

Relatore:

Dott.ssa Barbara Cardazzo

Correlatore:

Dott.ssa Nadia Andrea Andreani

Laureando:

Andrea Di Giuseppe

Matricola n. 1062678

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Alla mia famiglia

RIASSUNTO

Il gruppo tassonomico *Pseudomonas fluorescens* è uno dei principali responsabili dell'alterazione di numerose matrici alimentari.

Questi, oltre ad essere in grado di produrre pigmenti di varia natura, sono in grado di produrre diversi enzimi extracellulari, che provocano una diminuzione delle qualità organolettiche dei prodotti alimentari, apportando un ingente danno economico alle aziende.

Nel presente studio sono stati analizzati ceppi di campo del genere *Pseudomonas* sia dal punto di vista fenotipico sia biomolecolare. La caratterizzazione fenotipica è stata effettuata mediante la semina su terreni specifici e differenziali e ha permesso l'identificazione di ceppi produttori del pigmento blu che è stato riscontrato nei numerosi casi di "mozzarella blu", la caratterizzazione genotipica è stata condotta tramite la tecnica del *MultiLocus Sequence Typing* che ha permesso la creazione di un albero filogenetico per la valutazione delle relazioni filogenetiche tra i nuovi ceppi e quelli precedentemente campionati.

Ciò ha permesso di valutare che tutti i ceppi blu rientrano nel cosiddetto "*Blue Branch*".

Inoltre, è stata testata la capacità proteolitica di alcuni ceppi di *Pseudomonas fluorescens* tramite due test biochimica (il test del 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid ed il test dell'azocaseina) e la valutazione dell'espressione del gene *aprX* a diverse temperature. Tale studio ha rivelato una sostanziale eterogeneità ceppo- e temperatura- specifica della produzione delle proteasi.

Infine, è stato effettuato un test di *screening* per valutare la presenza/assenza del gene *aprX* nei ceppi di campo: il 93% dei ceppi presenta il gene codificante per la proteasi.

ABSTRACT

The *Pseudomonas fluorescens* group is one of the most important responsible taxon of spoilage of a big variety of food.

These microorganisms are able to produce pigments and many extracellular enzymes, causing the reduction of food quality, inducing damage to the food company.

In this study, we analyzed both phenotypically both genotypically field strains of the genus *Pseudomonas*. The phenotypic characterization was performed using specific and differential media, they allowed us to identify the strains able to produce the blue pigment, observed in the cases of “blue mozzarella cheese”, the genotypic characterization was performed through the MultiLocus Sequence Typing methods. It allowed us to create a phylogenetic tree to estimate the relationship between the new and the old isolated strains. We could observe that all the “blue strains” clustered in the “blue branch”

Furthermore, the proteolytic capability of some strains of *Pseudomonas fluorescens* was tested by the use of two biochemical test (the 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid and the azocasein test) and the evaluation of the expression of *aprX* gene at different temperatures. This study revealed an important strain- and temperature-specific heterogeneity of the production of the protease.

Finally, a screening test was implemented to evaluate the presence/absence of the *aprX* gene in field strains: the 93% of the strains presented the gene that codes for the protease.

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Caratteristiche del genere <i>Pseudomonas</i>	1
1.2 Tassonomia del genere <i>Pseudomonas</i>	3
1.3 Caratterizzazione di <i>Pseudomonas</i> mediante tecniche microbiologiche.....	7
1.4 Caratterizzazione di <i>Pseudomonas</i> mediante tecniche di biologia molecolare.....	9
1.5 Multi Locus Sequence Typing (MLST)	11
1.6 Approccio MLST sul genere <i>Pseudomonas</i>	13
1.7 <i>Pseudomonas</i> come patogeno per l'uomo	13
1.8 <i>Pseudomonas</i> negli alimenti.....	14
1.9 Attività alterante di <i>Pseudomonas</i> negli alimenti.....	17
1.10 La proteasi AprX	19
SCOPO DEL LAVORO	21
2. MATERIALI E METODI	23
2.1 Campionamento dei ceppi	23
2.2 Valutazione fenotipica dei ceppi di campo di <i>Pseudomonas fluorescens</i>	26
2.3 MLST	26
2.3.1 Estrazione	26
2.3.2 Applicazione dello schema <i>MultiLocus Sequence Typing</i> (MLST)	27
2.3.3 Allestimento della reazione di PCR.....	28
2.3.4 Protocollo termico di amplificazione	29
2.4 Elettroforesi su gel di agarosio	29
2.5 Sequenziamento dei prodotti PCR.....	30
2.6 Analisi bioinformatiche	31
2.6.1 FinchTV	31
2.6.2 Allineamento delle sequenze FOR e REV	32
2.7 Analisi filogenetiche.....	33
2.7.1 Identificazione dei <i>Sequence Type</i>	33
2.7.2 DNAsp per valutare la variabilità genetica.....	33
2.7.3 PhyML.....	34
2.8 SAGGIO TNBS	34
2.8.1 Preparazione dei campioni.....	35

2.8.2	Costruzione della retta di taratura	38
2.8.3	Valutazione degli aminoacidi liberi	39
2.9	Valutazione dell'espressione del gene <i>aprX</i>	39
2.9.1	Estrazione RNA.....	39
2.9.2	Retrotrascrizione dell'RNA.....	41
2.9.3	PCR <i>end-point</i> su cDNA	42
2.10	Test dell'azocaseina in ricotta	43
2.11	Screening per la presenza del gene <i>aprX</i>	45
3.	RISULTATI	47
3.1	Valutazione di caratteri fenotipici dei ceppi di campo di <i>Pseudomonas fluorescens</i>	47
3.2	<i>MultiLocusSequence Typing</i>	48
3.2.1	Amplificazione dei loci <i>glnS</i> , <i>gyrB</i> , <i>ileS</i> , <i>nuoD</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i>	48
3.2.2	Sequenziamento dei prodotti di PCR	49
3.2.3	Identificazione degli alleli e dei <i>SequenceType</i>	50
3.3	DNAsp per valutare la variabilità genetica	53
3.4	Analisi filogenetiche mediante il <i>software</i> PhyML.....	55
3.5	TNBS.....	57
3.5.1	Costruzione della retta di taratura	57
3.5.2	Saggio TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) per la valutazione della capacità proteolitica di ceppi <i>Type Strains</i>	57
3.5.3	Studio di espressione genica	59
3.5.4	Saggio dell'Azocaseina	60
3.5.5	Valutazione comparativa dell'attività proteolitica di ceppi <i>Type Strains</i>	61
3.5.6	<i>Screening</i> sulla presenza/assenza del gene <i>aprX</i>	62
4.	DISCUSSIONE.....	63
5.	BIBLIOGRAFIA.....	67

1. INTRODUZIONE

1.1 Caratteristiche del genere *Pseudomonas*

I batteri del genere *Pseudomonas* sono batteri Gram negativi, di forma bastoncellare, con dimensioni variabili (0,5-1 x 1,5-5,0 μm), sono provvisti di uno o più flagelli polari che ne permettono il movimento, privi di rivestimenti esterni e di capsula. Sono batteri asporigeni, ossidasi positivi e sono caratterizzati da un metabolismo chemioeterotrofo strettamente aerobio. Un gran numero di batteri di questo gruppo è in grado di degradare idrocarburi policiclici aromatici. Sono microrganismi mesofili e psicrotolleranti, aventi un *optimum* di crescita tra i 25 °C e i 35 °C, non sono in grado di sopravvivere a temperature che superano i 65-70 °C (quali ad esempio la pastorizzazione), ma sono in grado di moltiplicarsi a basse temperature e sopravvivere anche al di sotto degli 0 °C. Sono microrganismi normodurici, infatti non tollerano pH eccessivamente acidi: non si replicano a pH inferiore a 5 e rallentano moltissimo la loro replicazione già quando il pH scende al di sotto di 5,8 (Giaccone et al., 2010). Un'importante caratteristica dei batteri del genere *Pseudomonas* è quello di essere ubiquitari, infatti le loro scarse esigenze nutrizionali gli permettono di vivere in svariati ambienti quali acqua, suolo, vegetazione, materiale organico in decomposizione e sono inoltre in grado di adattarsi anche agli ambienti più ostili. Crescono con discreta rapidità su vari terreni batteriologici formando delle colonie tonde giallastre con un tipico odore d'uva. La loro grande capacità adattativa è dovuta sia alle loro scarse necessità nutrizionali che gli permettono di vivere anche in condizioni di carenza di nutrienti, sia grazie alla capacità di produrre vari pigmenti diffusibili, alcuni dei quali conferiscono solo colore, altri possono aiutare la competizione del microrganismo con altri, tra questi pigmenti ricordiamo:

- **Piocianina:** conferisce azione antibiotica nei confronti di altri batteri come lo *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*.
- **Pioverdina:** è il pigmento maggiormente prodotto con funzione siderofora, conferisce all'agar un colore verdastro.

- **Piorubina:** di colore rosso-marrone.
- **Piomelanina:** caratteristico colore nero.

I principali ceppi di *Pseudomonas* produttori di pigmento sono *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ludensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* (Gennari et al., 1992). La produzione di pigmenti è associata alla morfologia della cellula, alla sua attività, alla patogenicità, sono inoltre particolarmente utili alla sopravvivenza e alla protezione della stessa: vengono utilizzati per assorbire la luce UV, per eliminare i radicali liberi, nella resistenza a stress ambientali ed alcuni come la piocianina hanno proprietà antimicrobiche contro funghi batteri o lieviti patogeni. È curioso ricordare come alcuni siderofori siano implicati nel controllo della flora patogena dei vegetale, ne è un esempio l'utilizzo del ceppo di *Pseudomonas fluorescens* 3551 per il controllo di *Pytiiumultimum* che causa l'inumidimento del cotone (Loper, 1988), oppure l'utilizzo di *Pseudomonas fluorescens* A506 per la produzione di un antibiotico tossico per *Erwinia amylovora* agente della malattia delle piante nota come colpo di fuoco batterico delle pomacee (Todd N. Temple et al, 2004). Inoltre, la grande capacità di adattarsi ai vari ambienti è dovuta alla abilità nel creare biofilm (Boles et al., 2004), ovvero una comunità multicellulare di batteri sessili adesi l'un l'altro. Una volta che il batterio aderisce ad una superficie e l'adesione diviene irreversibile inizia la produzione di composti extracellulari (ex. esopolisaccaridi e proteine) che determinano la formazione della matrice. All'interno di questa la capacità di sopravvivenza della specie batterica è di molto superiore rispetto a quella della forma planctonica (nel caso di *P. aeruginosa* è stato studiato che la resistenza nei biofilm è mille volte superiore; Boles et al., 2004; Cleto et al., 2012). La formazione di tali comunità e la relativa resistenza ad agenti antimicrobici giustificano il fatto che *Pseudomonas* possa essere presente in vari substrati e in diverse condizioni ambientali. Un'alternativa alla vita sessile è rappresentata dal movimento e dalla migrazione. Nei rappresentanti del genere

Pseudomonas la motilità è resa possibile grazie alla rapida rotazione dei flagelli, permettendo una vasta gamma di possibilità di movimento come:

- **Swarming**: rapida (0,2 $\mu\text{m/s}$) e coordinata traslocazione di una popolazione batterica su un substrato solido o semi-solido.
- **Swimming**: il meccanismo di movimento è analogo allo *swarming*, ma il movimento è effettuato da una singola cellula.
- **Twiching**: avviene grazie alla presenza di un pilo di tipo IV che si protrae nella direzione del movimento, si ancora alla superficie permettendo la trazione della cellula microbica.

Oltre a movimenti legati alla presenza di pili e flagelli ne possiamo ricordare altri indipendenti da questi ultimi, come il *Gliding* e lo *Sliding*; quest'ultimo si basa sulla secrezione di agenti surfactanti in grado di ridurre l'attrito tra la cellula e la superficie in contatto con essa. Attualmente il genere *Pseudomonas* riscuote grande interesse grazie alle sue capacità alteranti nei confronti degli alimenti, esistono però delle specie patogene anche per l'uomo (sopra di tutte *P. aeruginosa*) in grado di infettare potenzialmente ogni distretto corporeo, ma responsabile soprattutto di infezioni a livello cutaneo, delle vie urinarie e dell'apparato respiratorio grazie alla presenza di numerosi fattori di virulenza. Nonostante ciò non è in grado di determinare patologie rilevanti in soggetti immunocompetenti. Altre specie potenzialmente patogene per l'uomo sono *P. putida*, *P. acidovorans* e *P. paucimobilis*. Alcune specie possono essere patogene per gli animali, come *P. anguilliseptica* (patogena per le anguille) e *P. chlororaphis* (patogena per gli uccelli; Peixet al. 2009), mentre altre ancora sono patogene per le piante: *P. syringae*, *P. pseudoalcaligenese* e *P. savastanoi*.

1.2 Tassonomia del genere *Pseudomonas*

I batteri del genere *Pseudomonas* nella classificazione scientifica appartengono alla Famiglia *Pseudomonadaceae*, Ordine *Pseudomonadales*, Classe γ -*proteobacteria*, Phylum *Proteobacteria*, Regno *Bacteria*, Domino *Prokaryota* (Silby et al., 2011). La complessità e la rilevanza che questo genere ha assunto nel corso degli anni ha

portato ad un continuo riesame dal punto di vista tassonomico. Il nome *Pseudomonas* venne assegnato dal professor Walter Emil Friedrich August Migula dell'istituto tedesco "Karlsruhe Institute" alla fine del XIX secolo. La sua descrizione del nuovo genere era scarna ed inaccurata, definendole "Cellule con organi polari di motilità. Alcune specie sono in grado di formare spore". Attualmente si sa che nessuna specie batterica del genere *Pseudomonas* è in grado di formare spore in nessun caso. Nonostante la descrizione non proprio scrupolosa, questa fu accettata dal mondo scientifico e nel 1923 venne introdotta nella prima edizione del "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*". L'etimologia del nome *Pseudomonas* potrebbe derivare dal greco *pseudo*=variabile e *monas*=forma, nonostante ciò, la scelta del nome *Pseudomonas* da parte del professor Migula sembra sia maturata per il semplice fatto che i batteri in questione assomigliavano ai *Monas*, microrganismi flagellati dotati di mobilità intrinseca. Come specie di riferimento, Migula propose inoltre *Pseudomonas pyocyanea*, in seguito rinominata *Pseudomonas aeruginosa* (Palleroni et al., 1973). Un importante passo in avanti fu effettuato grazie alla descrizione della versatilità nutrizionale dei batteri del genere *Pseudomonas*; nel 1926 infatti L.E. denDooren definì la capacità dei microrganismi del genere *Pseudomonas* di degradare molti composti organici, alcuni dei quali tossici per altri gruppi di batteri e organismi superiori (DenDooren et al., 1926).

Fino alla metà del XX secolo sono state assegnate oltre 800 specie batteriche al genere *Pseudomonas*: le identificazioni tassonomiche seguivano però unicamente i parametri descritti nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* da Haynes Burkholder, in cui venivano prese in considerazione caratteristiche prettamente fenotipiche come la crescita delle colonie in terreni agarizzati e le caratteristiche nutrizionali. Con il passare degli anni le tecniche microbiologiche basate sul fenotipo sono state rimpiazzate con metodi più moderni basati sullo studio di macromolecole quali l'ibridazione DNA-DNA. Queste analisi da una parte confermavano la similarità osservata in base alle proprietà fenotipiche fra ceppi dello stesso gruppo, dall'altra non permettevano di mettere alla luce omologie fra ceppi aventi simili caratteristiche

fenotipiche, suggerendo la presenza di differenze genotipiche fra gruppi assegnati allo stesso genere. Nel 1973, Palleroni e colleghi misero a punto una metodica basata sull'ibridazione RNA/DNA, misero alla luce differenze a livello di RNA ribosomiale oltre che a differenze evolutive. Hanno così suddiviso i vari ceppi in cinque gruppi (*rRNA Gruppo I, II, III, IV, V*). Di questi, il gruppo I è stato anche definito *Pseudomonas sensu strictu*, al quale appartengono *Pseudomonas aeruginosa*, tutte le *Pseudomonas* fluorescenti (*P. fluorescens*, *P. putida* e *P. syringae*) ed alcuni ceppi non fluorescenti (*Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomona spseudoalcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*). Attualmente la definizione in uso del genere *Pseudomonas* è “Il genere *Pseudomonas* è un'entità multigenerica che può essere suddivisa in cinque gruppi di specie abbastanza distanti, di cui soltanto uno può propriamente essere chiamato *Pseudomonas*”(Palleroni, 2010). Le specie racchiuse nel gruppo III sono state suddivise in tre generi differenti: *Comamonas*, *Acidovorax* e *Hydrogenophaga*, il gruppo II comprende *Pseudomonas* fitopatogene mentre il gruppo IV e V risultano molto distanziati rispetto agli altri tre (Palleroni et al., 2003).

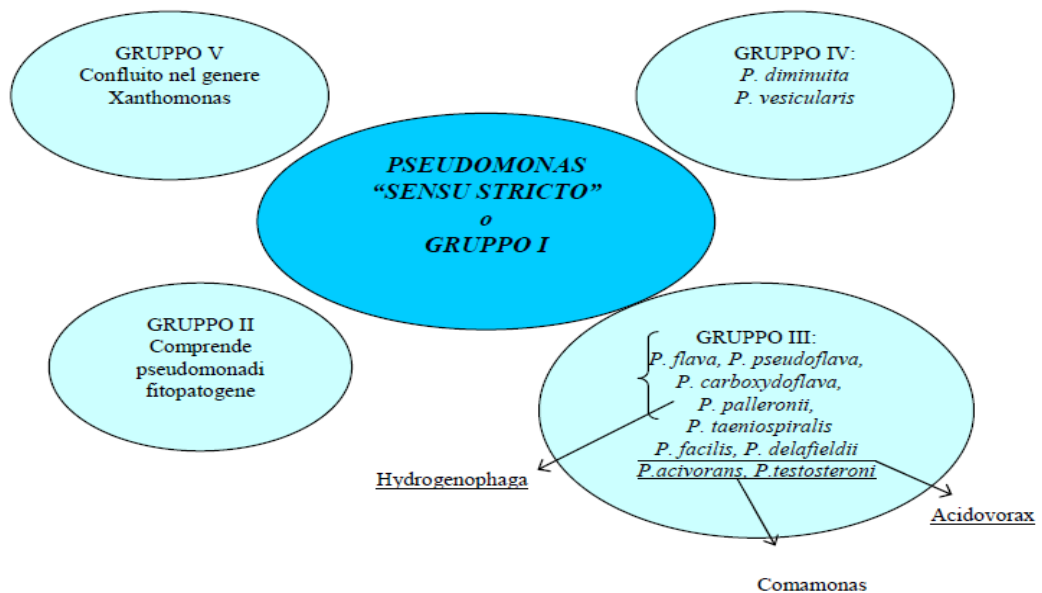


Figura 1: attuale suddivisione del genere *Pseudomonas*, come riportato nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*

Negli anni '90 grazie alla creazione di *database* e alla aumentata disponibilità di rRNA 16s si sono potute approfondire le analisi a livello genetico, identificando così tre classi di proteobatteri (α , β e γ). *Pseudomonas sensu strictu* appartiene al gruppo dei γ -*Proteobacteria*. In uno studio effettuato da Anzai e colleghi nel 2000 sono stati studiati 128 specie appartenenti al genere mediante l'analisi della sequenza completa dell'rRNA 16s, suddividendo così *Pseudomonas sensu strictu* in sette *sub-clusters*:(Anzai et al., 2000)

- *Pseudomonas syringae* group
- *Pseudomonas chlororaphis* group
- *Pseudomonas fluorescens* group
- *Pseudomonas putida* group
- *Pseudomonas stutzeri* group
- *Pseudomonas aeruginosa* group
- *Pseudomonas pertucinogena* group

Nonostante i grandi passi in avanti fatti grazie all'analisi di Anzai e colleghi per quanto riguarda la classificazione di *Pseudomonas species*, l'rRNA 16s, essendo altamente conservato ed avendo un basso tasso di evoluzione, non permette di discriminare tutte le varie specie. Proprio per questo con il passare del tempo è stato prima affiancato ed infine sostituito da metodi biomolecolari alternativi quali l'analisi di geni *housekeeping* come: *gyrB* ed *rpoD* (Yamamoto et al., 2000); *atpD*, *carA*, *recA* (Hilario et al., 2004); *rpoB* e *rpoD* (Mulet et al., 2009). È importante infine sottolineare come il numero di specie facenti parte del genere *Pseudomonas sensu strictu* tende ogni anno ad aumentare, c'erano 102 specie nel 2006, 109 nel 2007, 112 nel 2008 e 114 nel 2009 (Mulet et al., 2010). Attualmente per descrivere nuove specie bisogna soddisfare parametri richiesti dal concetto polifasico, in cui i dati molecolari devono essere implementati da una caratterizzazione fenotipica globale come: crescita a temperature controllate, produzione di pigmenti, richiesta di composti azotati o del carbonio, denitrificazione o

necessità di fattori di crescita. Prendendo in considerazione i dati riportati nel sito <http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>, attualmente sono state riconosciute 216 specie differenti all'interno del genere *Pseudomonas*.

1.3 Caratterizzazione di *Pseudomonas* mediante tecniche microbiologiche

Le tecniche microbiologiche sono delle metodiche che, nonostante siano state affiancate nell'arco degli anni da quelle molecolari (più esaustive ed efficaci), sono ancora utili nella caratterizzazione fenotipica, tramite esse è possibile infatti analizzare e caratterizzare il fenotipo di una coltura microbica.

Tra le varie tecniche microbiologiche abbiamo:

- **Caratterizzazione morfologica della cellula:** tramite la quale si possono descrivere forma, dimensione del batterio e presenza di flagelli mediante l'utilizzo di terreni di coltura agarizzati. Si possono anche valutare caratteristiche nutrizionali studiando la capacità dei microrganismi di degradare molecole come ad esempio acidi organici, aminoacidi o polialcoli (in quest'ultimo caso il terreno contiene indicatori di pH o si valuta la produzione di gas).
- **Crescita in diverse condizioni ambientali:** variazione di temperatura, pH, presenza di inibenti, nutrienti o additivi.
- **Profili di antibiotico-resistenza:** si va a valutare la capacità o meno di resistere ad un determinato antibiotico.
- **Tecniche immunochimiche:** utilizzando saggi ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) o RIA (*Radioimmunoassay*) per valutare la presenza di antigeni in base all'interazione antigeni-anticorpi.

Per l'isolamento e la conta di *Pseudomonas* spp. in matrici alimentari si fa riferimento alla norma ISO13720:1995. Questa prevede l'utilizzo di un

terreno selettivo per la crescita del batterio: *Pseudomonas Agar Base (PAB)* addizionato a tre differenti antibiotici: ceframide, fucidina e cefaloridina (*CFC supplement*) che permettono la crescita selettiva di *Pseudomonas*; il terreno prende quindi il nome di *CFC PAB*. Su di esso vengono piastrate quantità note di sospensione batterica a relative diluizioni, incubate a 25 °C per 48h in aerobiosi ed in seguito al trasferimento in terreni di crescita generici vengono sottoposte a test biochimici quali il test dell'ossidasi o fermentazione-ossidazione degli zuccheri. È inoltre importante valutare la presenza di pigmenti alla luce solare e ultravioletta. In alternativa, possono essere utilizzati kit commerciali di identificazione fenotipica che permettono di economizzare il processo e renderlo più rapido. Il kit più utilizzato è l'API20NE (No-Enterobacteriaceae), un sistema standardizzato per identificare batteri Gram negativi non enterici. È costituito da venti microtubi al cui interno sono presenti substrati disidratati che, se metabolizzati dal microorganismo in esame virano cromaticamente: il cambiamento può essere visualizzato direttamente oppure aggiungendo uno specifico reagente. Grazie alla combinazione di otto test convenzionali, dodici test di assimilazione del carbonio e un ricco *database* finale si può risalire così al microorganismo in esame grazie ad un numero identificativo. In alternativa, al sistema API può essere utilizzato il sistema BIOLOG GN, costituito da 95 pozzetti contenenti diversi composti organici. Nel pozzetto vi è la presenza di un indicatore cromatico: il tetrazolio, la cui riduzione è proporzionale alla respirazione batterica nel pozzetto, in seguito alla stessa c'è un cambiamento dalla colorazione violacea presente inizialmente ad una colorazione rosso-magenta (Johnsen et al., 1996). Altre analisi normalmente applicate si basano sulle caratteristiche di crescita delle colonie in terreni agarizzati, sull'osservazione dei microrganismi in seguito alla colorazione di Gram, sulla valutazione delle caratteristiche nutrizionali dei ceppi, test di motilità, test dell'ossidasi, test della catalasi e sulla capacità di crescita a differenti temperature di incubazione. Per quanto concerne le caratteristiche di crescita, queste vengono analizzate utilizzando specifici terreni tra cui: il *King Bagare* o il *King A agar*. Questi terreni sono frutto

del lavoro di King e colleghi che nel 1948 notarono che la produzione di siderofori dipendeva dalla composizione del mezzo di coltura in cui il microrganismo cresceva, e, in particolare, la produzione di fluoresceina dipendeva dalla concentrazione di solfato, ferro e magnesio.

I siderofori sono delle molecole prodotte da alcuni microrganismi in grado di legare il ferro, facilitando l'assorbimento all'interno della cellula. King e colleghi quindi prepararono due differenti terreni aventi potassio, sali di magnesio e glicerolo, al primo venne aggiunto *Proteose Peptone* e prese il nome di *King B*, l'altro vide l'aggiunta di peptone e fu chiamato *King A*. Il *King B agar* stimola la produzione di fluoresceina e inibisce la produzione di piocianina; in questo terreno *Pseudomonas aeruginosa* crea delle colonie circondate da un alone giallo-verde dato dalla produzione di fluoresceina che se esposta ai raggi UV emette fluorescenza; è invece visibile una colorazione verde brillante nel caso di una concomitante produzione di piocianina. Il *King A agar* invece va ad inibire la produzione di fluoresceina e a stimolare quella di piocianina. Quest'ultimo è un pigmento di colore blu ed è privo di fluorescenza. In questa tipologia di terreno, *Pseudomonas aeruginosa* forma colonie circondate da un alone blu-verde. Nonostante tale terreno stimoli prevalentemente la produzione di piocianina, possono essere prodotte anche piorubina (rosso), pioverdina (verde) e piomelanina (marrone).

1.4 Caratterizzazione di *Pseudomonas* mediante tecniche di biologia molecolare

Le tecniche di biologia molecolare negli anni hanno affiancato e a volte rimpiazzato le tecniche microbiologiche. Queste ultime infatti non danno informazioni esaustive riguardo l'identificazione di genere, di specie, di ceppo e le eventuali relazioni filogenetiche tra gli isolati, utili nell'identificazione di focolai di contaminazione legati a diversi prodotti. Le metodiche biomolecolari sono basate sullo studio delle macromolecole presenti all'interno della cellula e ci permettono di arrivare ad informazioni non ottenibili mediante le classiche metodiche microbiologiche. Le tecniche molecolari negli anni hanno preso sempre

più piede dal momento in cui i costi delle analisi sono diventati man mano più bassi ed i risultati sempre più specifici. Dal punto di vista legislativo mancano metodi ufficiali per l'identificazione e conta di *Pseudomonas* spp. nei prodotti alimentari, è presente solo una procedura analitica utilizzata per il rilevamento di *Pseudomonas aeruginosa* nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano e nelle acque ad uso ricreativo (ad esempio piscine). Nonostante ciò, enti di qualità deputati al controllo sulla salubrità degli alimenti come per esempio gli Istituti Zooprofilattici, hanno sviluppato numerosi approcci deputati al monitoraggio della qualità ed analisi degli alimenti. In uno studio del 1996, Johnsen e colleghi per l'identificazione di *Pseudomonas* isolate da matrici alimentari hanno utilizzato una metodica nota come REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic PCR*). È una tecnica che utilizza regioni palindromiche esterne ai geni, simili ai *primer* in una reazione di PCR, questa metodica permette l'identificazione di un *pattern* di bande in grado di discriminare anche tra isolati strettamente relazionati dal punto di vista filogenetico. Presso l'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e della Emilia Romagna è stato messo a punto un protocollo PGFE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) per la caratterizzazione di isolati di *Pseudomonas fluorescens* da prodotti lattiero-caseari. Si basa sulla separazione degli acidi nucleici in un campo elettrico variabile nel tempo per aumentare la risoluzione della separazione (Nogarol et al., 2010; Nogarol et al., 2013). In uno studio del 2007, Franzetti e colleghi hanno caratterizzato *Pseudomonas* isolati dagli alimenti mediante la tecnica dell'RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Tale metodica si basa sull'identificazione di polimorfismi nei siti di taglio di uno specifico enzima di restrizione. Questo enzima va a tagliare in maniera selettiva una sequenza polinucleotidica nota all'interno del genoma, nel caso in cui ci sia una mutazione all'interno del sito di riconoscimento dell'enzima, il taglio non avverrebbe e si formerebbero frammenti di lunghezza differente (Franzetti et al., 2007).

Il gruppo di ricerca di De Jonghe ha sviluppato un protocollo per l'identificazione di *Pseudomonas* basato sulla metodica DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), ovvero sull'osservazione della migrazione del DNA in un gel caratterizzato da un gradiente denaturante il quale condiziona la separazione dell'acido nucleico in base alla sua composizione nucleotidica (De Jonghe et al., 2011). Una metodica promettente per l'identificazione dei microrganismi sembra essere la MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*) che permette l'identificazione dei ceppi mediante l'analisi delle proteine ribosomiali (Pineda et al., 2003). Infine, il sequenziamento è una delle metodiche più utilizzate per l'identificazione di *Pseudomonas* isolati dagli alimenti. Il gene più utilizzato è il 16S, sebbene ad oggi sia sempre più diffuso l'approccio del *MultiLocus Sequence Typing*. Con la diffusione di queste nuove metodiche l'interesse si è spostato su caratteri molecolari alternativi quali:

- Lo studio del genoma batterico: ibridazione DNA-DNA, sequenziamento di specifici geni per lo più geni *housekeeping*, approcci MLST fino ad arrivare al sequenziamento dell'intero genoma (Palleroni, 2010).
- Lo studio della composizione lipidica: analisi mediante FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*; Ayyadurai N et al., 2007).
- Lo studio dei siderofori: *siderotyping* (isoelettrofocalizzazione dei siderofori; Meyer et al., 2002).

1.5 Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Per quanto riguarda la caratterizzazione genotipica dei ceppi di *P. fluorescens*, nonostante l'rRNA sia una buona fonte di informazioni, presente in tutti gli organismi e altamente conservato, possiede pochi siti informativi e quindi non è sempre in grado di permetterci di discriminare ceppi della stessa specie. Un metodo più specifico da questo punto di vista è sicuramente il *Multi Locus Sequence Typing* (MLST, Meiden, 1998), una tecnica che ci permette di discriminare in maniera universale

diversi ceppi all'interno della stessa specie. Si basa sull'analisi di geni *housekeeping*. Comparando, in seguito ad amplificazione e sequenziamento, le sequenze geniche ottenute con quelle presenti in un *database*, si possono identificare polimorfismi nucleotidici che ci permettono di distinguere differenti ceppi. La caratterizzazione mediante questa metodica risulta essere oggettiva, affidabile, trasferibile ad una vasta gamma di isolati ed in grado di fornire informazioni per la comprensione dell'epidemiologia dei focolai di contaminazione (Meiden et al., 2006). Il numero di frammenti che si analizzano varia dal livello di discriminazione che si vuole raggiungere relativamente ai generi e alle specie in esame. I classici schemi di MLST che permettono la discriminazione a livello di ceppo richiedono almeno l'analisi di 6-8 frammenti di geni *housekeeping* aventi lunghezza compresa fra i 400 e i 600 nucleotidi. Questi geni fanno parte del *core genome* e sono fondamentali nella cellula poiché codificano per proteine indispensabili nel metabolismo cellulare e quindi essenziali per la sopravvivenza batterica. Generalmente si scelgono geni molto espressi, codificanti una proteina con un elevato grado di "codon-bias" (la probabilità che un dato codone venga utilizzato per codificare un aminoacido rispetto ad altri codoni che codificano per lo stesso aminoacido). Vengono inoltre utilizzati geni non trasferibili orizzontalmente, con un buon potere discriminante, con dimensioni non eccessivamente elevate (per ottimizzare il sequenziamento) né limitate in modo da ottenere una quantità sufficiente di informazioni. Questi geni evolvono più lentamente di quelli "classici", ma più velocemente del 16S. In seguito al sequenziamento, l'identificazione di variazioni geniche porta all'identificazione di un nuovo allele qualora la sequenza non corrisponda ad una già presente nei *database*, generando così, a partire dalla combinazione degli alleli dei vari geni, il *Sequence Type* (ST). L'analisi di tali informazioni permette di definire quelle che sono le relazioni filogenetiche fra i ceppi analizzati e quelli di riferimento mediante la creazione di un albero filogenetico basato sul concatenamento ottenuto unendo i vari *loci* genici. Attualmente sono disponibili molteplici approcci MLST per la genotipizzazione di diversi

microrganismi quali: *Neisseria meningitidis* (Meiden et al., 1998), *Oenococcus oeni* (Bilhère et al., 2009), *Streptococcus mutans* (Do et al., 2010), *Pasteurella multocida* (Subaaharan et al., 2010), *Listeria innocua* (Chen et al., 2010), *Bifidobacterium* (Delétoile et al., 2010), la maggior parte dei quali è disponibile *online* sul sito internet <http://pubmlst.org/>.

1.6 Approccio MLST sul genere *Pseudomonas*

Come già citato precedentemente, quando si vuole fare un'analisi più dettagliata, quindi a livello di ceppo all'interno di una specie le analisi basate sull'rRNA a volte possono risultare non sufficienti. Già nello studio di Yamamoto et al (2000) alla classica analisi del 16S è stata affiancata quella di due specifici geni *housekeeping*: *gyrB* ed *rpoD*. Anche quattro anni dopo Hilario e colleghi per permettere un'identificazione di specie hanno analizzato geni quali *atpD*, *carA* e *recA*. Il primo vero studio basato sull'approccio MLST è stato svolto nel 2007 da Frapolli e collaboratori. Questo studio aveva l'obiettivo di identificare ciascuno dei 58 ceppi di *Pseudomonas* presi in esame al fine di differenziare ceppi produttori di un composto antimicotico utilizzato nel controllo di funghi patogeni nelle piante. Fu scelto un approccio multi genico basato su 10 *loci*: *rrs*, *dsbA*, *gyrB*, *rpoD*, *fdxA*, *recA*, *rpoB*, *fusS*, *rpsL* e *rpsG*. Un'importante applicazione di questa metodica fu attuata da Mulet e colleghi nel 2010. Questi analizzarono le sequenze nucleotidiche di quattro diversi *loci* genici del *core* del genoma batterico (16S, *gyrB*, *rpoD* e *rpoB*) al fine di capire in maniera specifica le relazioni filogenetiche tra 107 ceppi di *Pseudomonas* e definirne in modo preciso le specie. Uno studio più recente vede la caratterizzazione genotipica di 136 ceppi di *Pseudomonas* mediante l'analisi di sette geni *housekeeping*: *glnS*, *gyrB*, *ileS*, *nuoD*, *recA*, *rpoB* e *rpoD* (Andreani et al., 2014).

1.7 *Pseudomonas* come patogeno per l'uomo

I batteri del genere *Pseudomonas* sono considerati principalmente contaminanti ed alteranti degli alimenti. Nonostante tutto, il genere *Pseudomonas* è un gruppo altamente eterogeneo ed esistono anche dei ceppi lievemente o altamente patogeni per l'uomo come *Pseudomonas*

aeruginosa. Quest'ultimo può essere considerato un batterio molto virulento ed un microrganismo opportunisto per l'uomo, responsabile di molte infezioni nosocomiali che colpiscono prevalentemente individui immunocompromessi. Oltre a *Pseudomonas aeruginosa* ci sono anche dei ceppi batterici facenti parte del *Pseudomonas fluorescens group* in grado di indurre malattia nell'uomo. Per lo più, *Pseudomonas fluorescens*, essendo un componente della flora del cavo orofaringeo, può essere causa di infezioni post-trasfusionali e respiratorie in persone debilitate o con immunità compromessa (Gerhard et al, 2008).

1.8 *Pseudomonas* negli alimenti

Pseudomonas è un microrganismo ubiquitario, presente perciò in molti ambienti, dalle acque al suolo. Questa capacità è dovuta a varie sue caratteristiche tra cui le scarse esigenze nutrizionali e la capacità di tollerare un ampio *range* di temperature. Queste sue proprietà gli permettono di sopravvivere e spesso moltiplicarsi in molte tipologie di alimenti. Un metodo utilizzato per abbattere la carica batterica sono i trattamenti termici, come sopra ricordato, le alte temperature provocano infatti la morte del batterio. Ciò nonostante *Pseudomonas* spp. è in grado di produrre enzimi extracellulari termostabili come proteasi, lipasi e lecitinasi, in grado di resistere alle elevate temperature ed agire così a valle dei trattamenti termici. Un trattamento ad elevate temperature quindi causerebbe la morte del batterio ma questi enzimi continuerebbero a persistere nell'alimento (Marchand et al., 2008). L'attività di questi ultimi porta ad un'alterazione della matrice nonostante la carica batterica sia molto bassa *Pseudomonas* è stato isolato in un'ampia gamma di matrici di origine alimentare, quali prodotti di origine vegetale, alimenti *ready to eat*, pesce crudo e prodotti carnei, ma soprattutto prodotti lattiero-caseari (Andreani et al., 2014). La qualità microbiologica del latte crudo e di prodotti lattiero-caseari può essere parzialmente controllata mediante il mantenimento della catena del freddo, sfortunatamente però le comuni pratiche di raccolta e stoccaggio permettono la crescita di microrganismi psicrotolleranti, in grado di crescere a temperature anche al di sotto dei 7 °C nonostante le loro

temperature ottimali di crescita siano ben distanti da queste. Questi microrganismi psicrotrofi comprendono sia batteri Gram negativi che Gram positivi, tra cui rappresentanti di: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* (che sono sia psicrotrofi che termodurici), coliformi come *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. Nonostante questa variegata presenza di specie batteriche, *Pseudomonas* spp. sono gli organismi più comuni nel latte crudo e pastorizzato, rappresentando i batteri maggiormente limitanti la *shelf-life* nel latte. Questi comprendono: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. fragi*, *P. putrefaciens*, meno frequentemente *P. aeruginosa* (Munsch-Alatossava et al., 2005). La combinazione di elevati periodi di conservazione e delle basse temperature di refrigerazione vanno così ad agevolare la crescita di microrganismi psicrotolleranti. In molti vegetali la popolazione microbica più rappresentata è quella di *Pseudomonas*, in particolare le forme fluorescenti. Durante la lavorazione e lo stoccaggio, la carica microbica aumenta e questi giocano un ruolo fondamentale nell'imbrunimento dei vegetali, grazie alla loro attività pectinolitica. Nei vegetali le specie più rappresentative sono: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chicorii* e *Pseudomonas maltophilia*. (Franzetti et al., 2007). Prodotti ittici, soprattutto quelli stoccati in aerobiosi a temperature di refrigerazione, sono un buon substrato di crescita per microrganismi del genere *Pseudomonas* che sono considerati infatti i maggiori produttori di composti volatili responsabili del cattivo odore. Nel pesce vengono comunemente segnalate *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* che sono delle specie opportuniste dei prodotti ittici, mentre è stato notato che *Pseudomonas putida* può indurre delle gravi infezioni nella trota (Franzetti et al., 2007). Nella carne, *Pseudomonas* è stato isolato in una indagine svolta da Arnaut-Rollier dalla pelle dei broiler, sia in ambiente di macellazione sia dopo conservazione in ambienti di refrigerazione. Negli ambienti di lavorazione e nei laboratori di sezionamento è stato riscontrato *Pseudomonas ludensis* e *Pseudomonas fragi* (Arnaut-Rollier et al., 1999).

La contaminazione di *Pseudomonas* in prodotti lattiero-caseari ha attirato l'attenzione delle cronache in seguito allo scandalo delle "Mozzarelle blu" che nell'anno 2010 ha visto protagonisti l'Italia ed altri paesi europei. La causa di questo evento è stata la produzione, da parte di ceppi di *Pseudomonas*, di pigmenti che rendevano le mozzarelle di un anomalo colore blu. Il latte ed i suoi derivati infatti, grazie al suo valore nutrizionale, alla presenza di acqua ed al pH prossimo alla neutralità, è un substrato particolarmente favorevole per la crescita di svariati microrganismi. Nel latte, predominano principalmente ceppi di *Pseudomonas ludensis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas gessardii* (Marchand et al., 2009). Analisi effettuate dagli Istituti Zooprofilattici di Lazio e Toscana hanno rivelato un'elevata carica di *Pseudomonas* nelle mozzarelle (10^6 UFC/g di prodotto), quindi la tipologia di conservazione e la lunga *shelf-life* degli alimenti permettono, nonostante tutto, la crescita dei microrganismi con la conseguente produzione del pigmento responsabile dell'alterazione cromatica. La presenza di molecole pigmentate all'interno di prodotti lattiero-caseari come mozzarella o latte UHT sono testimonianza di una contaminazione avvenuta in seguito al trattamento termico. Quindi, nel momento in cui vengono trovate mozzarelle o latte UHT blu (rispettivamente sottoposti a *pastorizzazione* e *Ultra High Temperature*), la causa della contaminazione è riconducibile ad una non corretta applicazione delle norme igienico-sanitarie legate a tali produzioni. Un innalzamento del livello di contaminazione è da imputare alle successive condizioni di conservazione dei prodotti: possono essere effettuati errori frequenti quali l'interruzione della catena del freddo o la non corretta gestione dei prodotti ad opera del consumatore stesso. Nello studio di De Jonghe e colleghi del 2011 sono stati simulati in laboratorio le temperature ottimali e sub-ottimali dei processi di stoccaggio. Si è visto che in entrambe le condizioni la conta di *Pseudomonas* rimane costante nel tempo nonostante non aumenti esponenzialmente. Sebbene le condizioni ottimali di stoccaggio non inducano un aumento della carica batterica, vanno a favorire un aumento dell'attività della popolazione

microbica nella produzione di enzimi idrolitici termoresistenti, favorendo quindi la degradazione del prodotto (De Jonghe et al., 2011).

1.9 Attività alterante di *Pseudomonas* negli alimenti

Pseudomonas è un batterio ubiquitario, le sue scarse esigenze nutrizionali, la sua capacità di tollerare le basse temperature e la spiccata capacità di creare biofilm gli conferiscono la capacità di potersi sviluppare in un'ampia gamma di substrati e prodotti alimentari, arrecando ingenti danni economici al mercato alimentare. Una non corretta applicazione delle norme igienico-sanitarie nell'ambiente di lavoro può portare ad una successiva introduzione del microorganismo nell'alimento finito. La capacità alterante dei batteri del genere *Pseudomonas* non è però solo imputabile alla presenza di microrganismi vitali e quindi ad una elevata carica batterica, ma alla loro capacità di produrre enzimi idrolitici extracellulari come lipasi, proteasi e lecitinasi che, persistendo alle elevate temperature, vengono ritrovate all'interno dell'alimento anche in seguito al trattamento termico. Queste determinano un'alterazione del prodotto a livello organolettico, causando sia cambiamenti a livello strutturale sia determinando la produzione di odori sgradevoli. Le proteasi degradano principalmente la frazione della caseina (κ -, α_{s1} - e β -caseine) e inducono la formazione di una colorazione grigia, sgradevoli odori, sapori amari, gelatinizzazione dei prodotti, nonché una diminuzione del rendimento di caseificazione (Arslan et al., 2011). La produzione di tali proteasi è una caratteristica intrinseca dei ceppi di *Pseudomonas* e dipende strettamente dai substrati nutritivi dei quali essa dispone; le proteasi generalmente riscontrate appartengono alla classe delle metallo-proteasi e necessitano di calcio per svolgere l'attività proteolitica a carico della caseina. Inoltre, la produzione delle stesse è maggiormente marcata a 20 °C rispetto alle temperature di refrigerazione o a 30 °C. Esse sono stabili al trattamento termico, c'è inoltre una maggiore attività enzimatica in seguito al trattamento a 100 °C per 5 minuti dovuto al rilascio di proteasi presenti all'interno della cellula e liberate dopo la lisi cellulare, mentre si assiste a una riduzione della sua attività di un terzo dopo trattamento per 20 minuti

a 121 °C (Rajmohan et al., 2002). In un altro studio è stato dimostrato che il 95% dei ceppi presi in esame è proteolitico alla temperatura di 22 °C (Andreani et al., 2014). L'attività delle lipasi porta invece all'idrolisi dei trigliceridi in glicerolo ed acidi grassi, causando l'insorgenza di fenomeni come saponificazione e irrancimento dovuto alla produzione di acidi grassi a catena media. Come nel caso delle proteasi, anche l'attività di questo tipo di enzimi è influenzata dalla temperatura: sono infatti maggiormente attivi alle temperature di refrigerazione. Anche l'espressione di geni che codificano per questi enzimi può cambiare e varia infatti sia in funzione del ceppo sia in funzione di componenti del substrato di crescita (Rajmohan et al., 2002). L'ultima tipologia di enzimi extracellulari prodotti da questo genere di microrganismi sono le lecitinasi: queste vanno a rompere i globuli di grasso presenti nel latte, determinando una maggiore suscettibilità dei grassi all'attività delle lipasi. Nonostante alcuni studi descrivano la capacità proteolitica di *Pseudomonas* come una caratteristica positiva per combattere le allergie mediante la scissione di allergeni alimentari come β -lattoglobulina e α -lattoalbumina, si può nettamente affermare che *Pseudomonas* spp. è uno dei maggiori *spoiler* per i prodotti lattiero caseari (Guanhao et al., 2010). Un'ulteriore capacità alterante di *Pseudomonas* è riconducibile alla sua abilità di produrre molecole pigmentate o fluorescenti (già descritte in precedenza) che determinano un'alterazione cromatica dell'alimento; tra queste ricordiamo la piocianina e i carotenoidi. Nella tabella sottostante (Tabella 1) sono riportate le alterazioni cromatiche e le relative fonti di isolamento più frequenti ritrovate sugli alimenti imputabili alla produzione di pigmenti da parte di microrganismi del *Pseudomonas fluorescens* group.

<i>Colorazione</i>	<i>Batteri responsabili</i>	<i>Fonti di isolamento</i>	<i>Note</i>
Giallo-blu-viola	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Acqua minerale, acqua di processo	Responsabili di mozzarella con colorazione multifocale giallo-violacea
Giallo	<i>Pseudomonas synxantha</i>	Latte amaro	Responsabili di casi “latte giallo”
Giallo-verde	<i>Pseudomonas fluorescens biovar I e V</i>	Serbatoi di prefiltro, fanghi attivi e alimenti	
Blu-verde	<i>Pseudomonas fluorescens biovar IV</i>	Serbatoi di prefiltro, fanghi attivi e alimenti	Responsabili di casi di mozzarella blu. La formazione di pigmento è favorita dalla presenza di ossigeno
Blu	<i>Pseudomonas libanensis</i> <i>Pseudomonas tolasii</i>	Acqua di sorgente Funghi coltivati	Responsabile di casi di mozzarella blu
Fluorescenza	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ceppi isolati da latte pastorizzato, formaggio, mozzarella, <i>sushi</i> , carne ed insalata	Principali produttori di pigmenti fluorescenti all'interno del genere <i>Pseudomonas</i>

Tabella 1 Ceppi di *Pseudomonas* con corrispettivi pigmenti prodotti e fonti di isolamento

1.10 La proteasi AprX

Il gene *aprX* codifica per una metallo-proteinasi alcalina resistente alle alte temperature implicata nell'alterazione degli alimenti trattati termicamente (latte pastorizzato e UHT), appartiene alla famiglia delle serralisine. Queste proteasi sono state identificate in svariati ceppi di *Pseudomonas* spp (Chessa et al., 2000) e la loro attività sulle caseine è stata dimostrata in vitro (Dufour et al 2008). Il sequenziamento del gene *aprX* in diversi ceppi di *Pseudomonas* appartenenti al *fluorescens* group ha dimostrato una notevole conservazione a livello nucleotidico (Marchand et al 2009). Le proteasi AprX sono state proposte come *marker* biologico nella contaminazione batterica nel latte (Decimo et al., 2014).

SCOPO DEL LAVORO

Data la grande importanza dei batteri del genere *Pseudomonas* per quanto riguarda l'alterazione dei prodotti alimentari, lo scopo di tale lavoro di tesi è stata la caratterizzazione fenotipica e genotipica di 7 ceppi di campo di *Pseudomonas fluorescens* provenienti da diverse matrici alimentari, nonché la valutazione della capacità proteolitica di alcuni ceppi appartenenti al gruppo *Pseudomonas fluorescens*. La caratterizzazione fenotipica ha permesso di individuare i ceppi produttori del pigmento blu, responsabile di frequenti eventi di alterazione a carico di diverse matrici alimentari. La caratterizzazione genotipica, effettuata mediante l'applicazione della metodica *MultiLocus Sequence Typing (MLST)* e la successiva unione dei dati ottenuti con quelli già in possesso dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Barbara Cardazzo, hanno permesso di raggruppare i ceppi in distinti *cluster* filogenetici e di individuare le relazioni tra i ceppi in analisi. La seconda parte del lavoro ha visto la valutazione del potenziale proteolitico dei ceppi oggetto di studio mediante l'applicazione del test TNBS (2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) e del test dell'azocaseina al fine di valutare l'attività proteolitica di ceppi *Type Strains*, nonché la valutazione dell'espressione del gene *aprX*, codificante per la proteina AprX, principale imputata delle alterazioni a carico dei prodotti lattiero-caseari. Infine, è stato effettuato lo screening di 68 ceppi di campo per valutare la diffusione del gene *aprX*.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento dei ceppi

In questa tesi sono stati utilizzati 18 *Type Strains* rappresentanti diverse specie del *taxon Pseudomonas fluorescens* provenienti dalla ceppoteca tedesca DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) e dalla ceppoteca spagnola CECT (*Colección Española de Cultivos Tipo*). Le specie sono state scelte da precedenti studi in modo da ricoprire con specie sufficientemente diverse tra di loro l'intero *taxon*. I ceppi di riferimento utilizzati sono riportati nella Tabella 2.

CEPPO	Codice di riferimento nello studio	Specie batterica	Fonte di isolamento
DSM17152T	DSM1	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Acqua minerale
DSM15294T	DSM2	<i>Pseudomonas brenneri</i>	Acqua minerale
DSM17967T	DSM3	<i>Pseudomonas mandelii</i>	Acqua minerale
DSM17150T	DSM4	<i>Pseudomonas jessenii</i>	Acqua minerale
DSM16610T	DSM5	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Terreno agricolo
DSM17489T	DSM6	<i>Pseudomonas orientalis</i>	Acqua di sorgente
DSM18928T	DSM7	<i>Pseudomonas synxantha</i>	Panna
DSM18862T	DSM8	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Risaie
DSM6252T	DSM9	<i>Pseudomonas ludensis</i>	Carne di manzo
DSM14020T	DSM10	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Acqua minerale naturale
DSM11331T	DSM11	<i>Pseudomonas veronii</i>	Acqua minerale
DSM17149T	DSM12	<i>Pseudomonas libanensis</i>	Acqua di sorgente
DSM50415	DSM13	<i>Pseudomonas lemonnieri</i>	Terreno
CECT 124T	CECT1	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Pomodoro
CECT 229T	CECT2	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Indivia
CECT 378T	CECT3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Serbatoi di pre-filtro
CECT 446T	CECT4	<i>Pseudomonas fragi</i>	Informazione non disponibile
CECT 4470T	CECT5	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Contaminante di piastra

Tabella 2 Nella tabella sono riportati: il nome dei ceppi di riferimento , il codice di riferimento assegnato in questo studio, la specie batterica e la fonte di isolamento

Sono stati inoltre presi in esame 79 ceppi di *Pseudomonas* spp. che sono stati oggetto di un precedente studio (Andreani et al., 2014) in aggiunta a 7 nuovi ceppi arrivati in laboratorio. Questi ceppi sono riportati in Tabella 3. I 7 ceppi analizzati per la prima volta in questo lavoro sono

evidenziati in tabella dallo sfondo azzurro. Tutti i ceppi di *Pseudomonas* analizzati sono stati isolati in purezza e stoccati a -80°C in TSB (*Tryptic Soy Broth*) e glicerolo (50%w/w) nella ceppoteca del laboratorio della Dott.ssa Barbara Cardazzo.

Ceppo	Codice di riferimento laboratorio	Fonte di isolamento	Provenienza
ps_1	18	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_2	22	Mozzarella	Germania
ps_3	23	Mozzarella	Italia
ps_4	31	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_5	52	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_6	57	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_7	61	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_8	77	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_9	84	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_10	92	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_11	95	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_12	98	Burro	Germania
ps_13	100	Mozzarella	Germania
ps_14	139	Carne di maiale	Nord-Est Italia
ps_15	3bol	<i>Trota marmorata</i>	Nord-Est Italia
ps_16	6bol	<i>Trota fario</i>	Nord-Est Italia
ps_17	33Ae	Ricotta	Nord-Est Italia
ps_18	L2-2	UHT latte	Italia
ps_19	L3-1	UHT latte	Italia
ps_20	L3-4	UHT latte	Italia
ps_21	MOZ2	Mozzarella	Italia
ps_22	MOZ3	Mozzarella	Italia
ps_23	MOZ5	Mozzarella	Italia
ps_24	PISA 3	Formaggio	Centro Italia
ps_25	PISA 4	UHT latte	Centro Italia
ps_26	H6Ae	Caso di infezione umana	Nord-Est Italia
ps_27	602a	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_28	602b	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_29	602c	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_30	602d	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_31	602e	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_32	602f	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_33	602h	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_34	602i	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_35	602l	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_36	602m	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_37	602qc	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_38	602qi	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_39	602r	Insalata mista	Nord-Est Italia
ps_40	603g	Ricotta	Nord-Est Italia
ps_41	Pse11	Carne di suino	Nord-Est Italia

ps_42	Pse12	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_43	Pse13	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_44	Pse15	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_45	Pse16	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_46	Pse19	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_47	Pse21	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_48	Pse24	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_49	Pse26	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_50	Pse29	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_51	Pse30	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_52	Pse38	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_53	Pse39	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_54	Pse44	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_55	Pse46	Carne di suino	Nord-Est Italia
ps_56	761 5	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_57	762 1	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_58	762 2	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_59	762 3	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_60	762 5	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_61	763 1	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_62	763 2	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_63	763 3	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_64	763 4	Sashimi	Nord-Est Italia
ps_65	815b	Rucola "Ready-to-Eat"	Nord-Est Italia
ps_66	815 m	Rucola "Ready-to-Eat"	Nord-Est Italia
ps_67	816d	Rucola "Ready-to-Eat"	Nord-Est Italia
ps_68	816o	Rucola "Ready-to-Eat"	Nord-Est Italia
ps_69	Pse48	Prodotto lattiero-caseario	Nord-Est Italia
ps_70	Pse49	Prodotto lattiero-caseario	Nord-Est Italia
ps_71	Pse50	UHT latte	Nord-Est Italia
ps_72	Pse51	Prodotto lattiero-caseario	Nord-Est Italia
ps_73	Pse52	Prodotto lattiero-caseario	Nord-Est Italia
ps_74	Pse54	Prodotto lattiero-caseario	Nord-Est Italia
ps_75	62	Mozzarella	Nord-Est Italia
ps_76	PISA 1	Mozzarella	Centro Italia
ps_77	uk1	Carne di manzo	Inghilterra
ps_78	uk4	Mozzarella	Inghilterra
ps_79	Bb	Carne di suino	Nord-Est Italia
SAL1	SAL1	Salame suino	Nord-Est Italia
BU3	BU3	Burro	Nord-Est Italia
PCA3	PCA3	Burro	Nord-Est Italia
EL1	EL1	Ricotta	Nord-Est Italia
ML1	ML1	Mozzarella	Nord-Est Italia
811/2	811/2	Mozzarella	Nord-Est Italia
811/1	811/1	Mozzarella	Nord-Est Italia

Tabella 3 La tabella riporta il nome del ceppo, il codice di riferimento conferitogli in laboratorio, la fonte di isolamento ed il luogo di isolamento. I ceppi evidenziati di azzurro sono i nuovi ceppi arrivati in laboratorio.

2.2 Valutazione fenotipica dei ceppi di campo di *Pseudomonas fluorescens*

I 7 nuovi ceppi di campo sono stati sottoposti ad indagine fenotipica al fine di valutare l'effettiva appartenenza al genere *Pseudomonas* e la capacità di produrre il pigmento blu. Sono stati utilizzati due differenti terreni: il *Pseudomonas Agar Base* (PAB, Oxoid), ovvero uno specifico terreno selettivo e differenziale, addizionato a *CFC Pseudomonas Supplement* (CFC). Quest'ultimo è un supplemento costituito da tre differenti antibiotici (cetramide, fucidina e cefaloridina; Biolife Italiana, Milano, IT) ed il *Potato Dextrose Agar* (PDA, Biokar Diagnostic, Beauvais, FR). Il primo è un terreno specifico per *Pseudomonas* spp., che permette la crescita di batteri esclusivamente di questo genere, il secondo è un terreno consigliato in bibliografia per la valutazione della produzione del pigmento blu. Utilizzando un'ansa sterile i ceppi sono stati seminati sui due terreni utilizzando la tecnica di semina dei quattro quadranti, dopodichè sono stati incubati a 22 ° C per 48h, per la successiva valutazione dei caratteri fenotipici.

2.3 MLST

2.3.1 Estrazione

Con la finalità di applicare lo schema MLST ai ceppi SAL1, BU3, PCA3, EL1, ML1, 811/1e 811/2, la cui caratterizzazione era stata precedentemente effettuata solo con metodiche microbiologiche, i ceppi sono stati rivitalizzati a 22 °C per 48h in PAB. Ottenendo così colonie isolate e pure, si è passati alla fase di estrazione del DNA. In questo caso si è utilizzato il metodo di estrazione per bollitura, un metodo rapido ed efficace quando si vogliono effettuare analisi che non richiedono un eccessivo grado di pulizia del DNA. Con un'ansa sterile è stata prelevata una colonia e stemperata in una provetta da 0.2ml contenente 100µl di acqua BDH (acqua bidistillata), ottenendo così una sospensione batterica. A questo punto le provette sono state inserite all'interno del

termociclatore EuroClone CELBIO e trattate termicamente a 94 °C per 10 minuti. Questo trattamento termico ha permesso di rompere la membrana batterica favorendo così la fuoriuscita dell'acido nucleico nella soluzione acquosa. A questo punto le provette sono state centrifugate a 14000 rpm per 2 minuti al fine di creare un *pellet* sul fondo della provetta lasciando il DNA in soluzione. Il surnatante è stato così prelevato e posto in una provetta pulita; questa conteneva il DNA madre che è stato in seguito diluito 1:100 in acqua BDH e conservato alla temperatura di -20 °C.

2.3.2 Applicazione dello schema *MultiLocus Sequence Typing* (MLST)

Nel presente studio sono state amplificate mediante la tecnica classica di *PCR-end point* sette porzioni geniche facenti parte del *core* genomico di *Pseudomonas*, secondo lo schema riportato nell'articolo di Andreani et al., 2014.

Le porzioni geniche sono situate all'interno dei seguenti geni:

- *glnS*: glutamyl-tRNA synthetase;
- *gyrB*: DNA gyrase subunit B;
- *ileS*: isoleucyl-tRNA synthetase;
- *nuoD*: NADH dehydrogenase I chain D;
- *recA*: recombinase A;
- *rpoD*: RNA polymerase subunit- α ;
- *rpoB*: RNA polymerase subunit- β .

Per l'amplificazione di queste porzioni sono state utilizzate sette differenti coppie di *primer* proposte nel lavoro di Andreani et al., 2014. I *primer* sono riportati nella Tabella 4.

Primer	Sequenza	Dimensioni amplicone	T_m (°C)
<i>glnS</i>	ACCAACCCGGCCAAGAAGACCAGG(24) TGCTTGAGCTTGCGCTTG(18)	710 pb	64.7 56.0
<i>gyrB</i>	GGTGGTCGATAACTCCATCG(20) CGCTGAGGAATGTTGTTGGT(20)	704 pb	59.4 57.3
<i>ileS</i>	TTCCAATGAARGCCGGCCTGCC(23) GGGGTGGTGGTCCAGATCACG(21)	633 pb	66.9 65.7
<i>nuoD</i>	GAAGTCCTGACCTTCTGC(19) GAAGAACTCGGCCATCATG(19)	771 pb	59.9 59.7
<i>recA</i>	TGGCTGCGGCCCTGGGTCAGATC(23) ACCAGGCAGTTGGCGTTCTTGAT(23)	573 pb	69.6 62.4
<i>rpoB</i>	TGGCCGGTCGTCACGGTAACA(21) CCGAAACGCTGACCACCGAAC(21)	610 pb	64.8 64.3
<i>rpoD</i>	CTGATCCAGGAAGGCAACATCGG(23) ACTCGTCGAGGAAGGAGCG(19)	631 pb	64.5 65.6

Tabella 4 La tabella riporta il nome delle sette coppie di *primer* utilizzate per l'approccio MLST, la sequenza nucleotidica, la dimensione degli ampliconi e la temperatura di *melting* (Andreani et al., 2014)

2.3.3 Allestimento della reazione di PCR

La miscela di reazione per effettuare l'amplificazione mediante PCR aveva un volume finale di 20 µl ed era così composta:

REAGENTI	CONCENTRAZIONE REAGENTI	Quantità (µL)
<i>Buffer di reazione 5X</i>	1X	4 µL
MgCl₂ 25 mM	1.5 mM	2 µL
dNTPs 25 µM ognuno	0.1 mM	0.112 µL
<i>Primerforward</i> 10 µM	0.1 mM	0.25 µL
<i>Primer reverse</i> 10 µM	0.1 mM	0.25 µL
Taq Polimerasi 5 U/µl	0.8 U	0.1 µL
DNA 2 ng/µl	10 ng	2.5 µL
H₂O BDH	Fino a 20 µl	10.78 µL

Tabella 5 La tabella riporta i reagenti utilizzati per la reazione di PCR con le relative concentrazioni e quantità.

L'enzima utilizzato per la reazione di PCR è la GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), la quale è posta in soluzione in un *buffer* contenente Tris-HCl 50 mM a pH 8.0 a 25 °C, NaCl 100 mM, EDTA 0.1

mM, glicerolo al 50% e Triton X-100 allo 0.1%. Il kit commerciale della Promega fornisce, inoltre, anche il *buffer* di reazione (GoTaq® Flexi Buffer) contenente KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 9.0 a 25°C e Triton X-100 allo 0.1%.

2.3.4 Protocollo termico di amplificazione

Il protocollo termico è il medesimo per tutte e sette le porzioni geniche amplificate. L'amplificazione delle sequenze è avvenuta utilizzando il termociclatore EuroClone CELBIO seguendo il seguente protocollo termico.

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Numero cicli
Attivazione Taq polimerasi	94°C	2 minuti	1 ciclo
Denaturazione	94°C	20 secondi	35 cicli
Annealing ed estensione	60°C	30 secondi	
Estensione	72°C	1 minuto	
Estensione finale	72 °C	7 minuti	1 ciclo

Tabella 6 La tabella descrive il ciclo termico impiegato per la reazione di PCR

2.4 Elettroforesi su gel di agarosio

Per valutare la qualità delle sequenze amplificate, queste sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di agarosio. Per fare ciò, è stato utilizzato un gel di agarosio all'1,8%. Il gel è stato preparato usando un tampone a bassa forza ionica, quale il TAE, utilizzato anche come tampone di corsa elettroforetica. Questo permette la conduzione di corrente elettrica, ed è composto da: Tris 2M, acido acetico glaciale 1M e EDTA 0.1M. La preparazione è stata effettuata sciogliendo l'agarosio (Gelliphore, Euroclone) in TAE 1X alla temperatura di ebollizione, aggiungendo SYBR®*Safe* a una concentrazione di 0.1 mg/ml e

introducendo il tutto nella cameretta di corsa. L'utilizzo del SYBR[®] *Safe* (Invitrogen) è un passaggio fondamentale per la visualizzazione del DNA nel gel; è un intercalante degli acidi nucleici a ridotta mutagenicità ed elevata sensibilità. Esso è un composto organico aromatico dotato di attività fluorofora. Intercalandosi con il DNA, il complesso formato assorbe luce blu a una lunghezza d'onda compresa tra 280 e 520 nm ed emette luce verde a una lunghezza d'onda di 522 nm. Avvenuta la solidificazione, il gel è stato introdotto nella vaschetta per l'elettroforesi e ricoperto con TAE 1X. Il caricamento dei campioni è stato effettuato unendo 5 µl di amplificato di PCR e 5 µl di *Loading Buffer 2X Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega). Nei pozzetti alle estremità del gel è inoltre stato caricato un marcatore di pesi molecolari da 100 pb (100 bp DNA *Ladder*, BIOLABS). Il gel è stato poi fatto correre a 100 V, 400 mA e 100 W per circa quaranta minuti, dopodichè la corsa elettroforetica è stata visualizzata mediante l'esposizione alla radiazione UV sul transilluminatore. Nel nostro caso è stato utilizzato lo strumento Gel Doc XR[™] (Biorad), che permette l'esposizione del gel d'agarosio alla radiazione ultravioletta e di effettuare la fotografia dell'immagine.

2.5 Sequenziamento dei prodotti PCR

Il sequenziamento dei frammenti genici è stato effettuato da MacroGen EU (Meibergdreef, Amsterdam, The Netherlands) tramite il metodo Sanger. Questo metodo si basa su un'ulteriore reazione di amplificazione del prodotto di PCR ottenuto in precedenza, con l'utilizzo di nucleotidi modificati (nucleotidi dideossitri-fosfato, ddNTPs) che portano all'interruzione della reazione di sintesi dei nuovi filamenti. Questi nucleotidi modificati hanno la stessa struttura dei normali nucleotidi, eccetto per la presenza all'estremità 3' di un idrogeno al posto del gruppo ossidrilico (-OH) che porta al blocco dell'allungamento della catena. La polimerizzazione avviene ad opera della DNA polimerasi a partire da un unico *primer* usato come innesco e nella miscela di reazione sono presenti i nucleotidi classici (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e i ddNTPs che vengono marcati con fluorofori diversi per essere successivamente discriminati l'uno dall'altro. Prima di essere

sequenziato, il DNA viene denaturato in singolo filamento e, in seguito all'appaiamento del *primer*, vengono incorporati in modo casuale i nucleotidi (dNTPs o ddNTPs). L'amplificazione permette così la creazione di frammenti di diversa lunghezza, i quali vengono successivamente separati mediante una corsa elettroforetica capillare, permettendo il riconoscimento del ddNTP finale ad opera di un laser.

2.6 Analisi bioinformatiche

2.6.1 FinchTV

L'*output* del sequenziatore è stato visualizzato ed analizzato mediante l'utilizzo di appositi programmi; nel nostro caso il programma utilizzato è *FinchTV* versione 1.4.0 (Geospiza, Inc). Esso permette di visualizzare i cromatogrammi, cioè le rappresentazioni grafiche che ci consentono di identificare la sequenza nucleotidica sequenziata. Ogni picco rappresenta una delle quattro basi azotate del frammento in esame. Tale programma ha permesso dapprima la valutazione della qualità del sequenziamento, valutando la presenza di eventuali doppi picchi o di "N" dovuta all'incerta assegnazione di un nucleotide in una determinata posizione, oltre all'ottenimento delle sequenze in formato FASTA, necessarie per le analisi successive. Tale formato presuppone che il nome della sequenza sia preceduto dal segno di maggiore (>), mentre la sequenza è riportata nella riga seguente senza spazi.

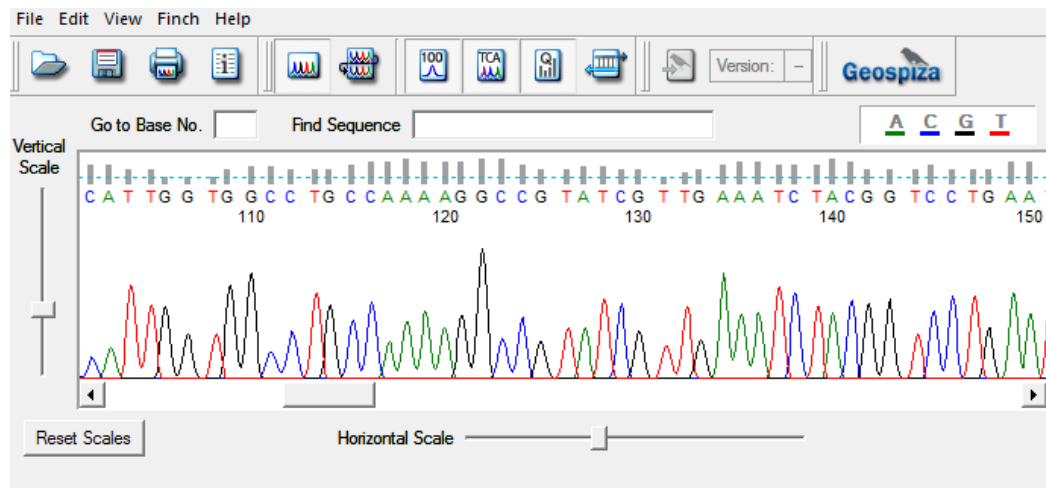


Figura 2 La figura riporta un esempio di cromatogramma ottenuto dal sequenziamento con metodo Sanger.

2.6.2 Allineamento delle sequenze FOR e REV

Per ogni campione è stata eseguita la reazione di sequenziamento utilizzando il *primer forward* e confermando la sequenza mediante il sequenziamento di prodotti di PCR risultanti da una seconda amplificazione con il *primer reverse*. Grazie a questo siamo stati in grado di avere un'ulteriore conferma della sequenza nucleotidica. L'allineamento è stato effettuato mediante il *software online* ClustalW, con la finalità di verificare la completa omologia di sequenza dei due cromatogrammi ottenuti per ogni campione. ClustalW produce allineamenti multipli di sequenze di acidi nucleici e di proteine. Esso calcola il miglior *match* tra le sequenze e le allinea in modo da visualizzarne le identità, le similarità e le differenze tra le stesse. Per far ciò, il *software* allinea dapprima le sequenze a coppie, calcolandone le distanze filogenetiche e identificando un albero approssimativo con il metodo Neighbour-Joining; l'albero determina così l'ordine con il quale le sequenze sono analizzate. L'*output* del programma mostra l'allineamento ponendo un «*» in corrispondenza dei nucleotidi conservati tra tutte le sequenze. Confermato l'allele per ogni campione per ciascuno dei 7 frammenti genici scelti per l'analisi MLST, essi sono stati tagliati in frammenti di dimensioni uguali corrispondenti alla

medesima regione genica e riportati in formato FASTA. Le sequenze di ogni gene, riportate in ordine alfabetico, sono state unite in un'unica sequenza ciascuno in direzione 5'→3'. Tale sequenza viene chiamata concatenamero ed è stata utilizzata per le successive analisi bioinformatiche.

2.7 Analisi filogenetiche

2.7.1 Identificazione dei *Sequence Type*

L'identificazione dei *Sequence Type* è stata effettuata mediante il *software online* Datamonkey. È uno strumento per effettuare analisi filogenetiche usato in biologia evolutiva che permette lo *screening* di sequenze omologhe. Sono state considerate per questa analisi: le sette differenti sequenze ottenute dai nuovi ceppi, tutti i ceppi precedentemente caratterizzati (Tabella 3) oltre alle sequenze dei 6 genomi completi disponibili online e appartenenti al gruppo *Pseudomonas fluorescens* (NC_012660.1, NC_007492.2, NC_004129.6, NC_015379.1, NC_017911.1, NC_016830.1). Nel nostro caso, Datamonkey è stato impiegato per evidenziare sequenze con totale omologia, alle quali è stato assegnato il medesimo numero allelico, nonché per verificare la presenza di codoni di stop che potevano essere dovuti ad errori nelle sequenze in analisi. Per un'ulteriore conferma, le stesse sequenze sono state inserite in un *database online* specifico per la tipizzazione molecolare tramite MLST di *Pseudomonas fluorescens* (<http://pubmlst.org/pfluorescens/>), che ha permesso di identificare quali degli alleli riscontrati nei 7 nuovi ceppi erano stati rinvenuti nei ceppi precedentemente analizzati e depositati sul *database*. Le combinazioni alleliche ottenute hanno permesso la generazione del *Sequence Type* risultante dalla combinazione del numero allelico dei vari *loci*. Ceppi aventi la medesima combinazione allelica presentano dunque lo stesso ST.

2.7.2 DNAsp per valutare la variabilità genetica

Mediante l'utilizzo del *software* DNAsp sono stati messi in evidenza alcuni parametri relativi ai 7 loci analizzati e al concatenamero. Questo

software ci ha permesso di valutare la percentuale di G-C presente nelle sequenze dei singoli *loci* e dei concatenamenti, il numero di polimorfismi e di siti informativi della parsimonia, il tasso di mutazioni sinonime e non sinonime, i valori Θ (numero medio di differenze nucleotidiche per sito) e π (diversità nucleotidica per sito) e il valore D del test di Tajima. Con il *D-test* di Tajima, la deviazione dell'ipotesi della neutralità viene ottenuta confrontando la media delle differenze nucleotidiche a coppie tra le sequenze con il numero di siti segreganti (numero delle posizioni nucleotidiche in cui viene riscontrato un polimorfismo). La popolazione è in equilibrio mutazionale neutrale quando il valore D è uguale a 0 e quindi gli incroci sono avvenuti in modo casuale (*random mating*), mentre con valori compresi tra 2 e -2 si ottengono dati significativi.

Il *software* ha richiesto la creazione di un unico file di *input* per ciascuno dei loci e per il concatenamento, rappresentato dall'allineamento delle sequenze geniche, ottenuto mediante il software MEGA (Versione 5.1).

2.7.3 PhyML

Per la creazione di un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* è stato utilizzato il *software online* PhyML. Questo *software* effettua dapprima un allineamento delle sequenze che gli vengono sottoposte, dopodiché calcola la probabilità che l'allineamento osservato si sia verificato con un determinato modello di evoluzione precedentemente scelto. Partendo da un primo albero, il *software* esplora tutte le possibili relazioni filogenetiche per identificare l'albero *Maximum Likelihood*. In questo caso per ottenere l'albero sono state utilizzate le impostazioni di *default* mediante l'applicazione "One-click" che utilizza l'algoritmo *Maximum Likelihood*.

2.8 SAGGIO TNBS

Al fine di testare il potenziale proteolitico dei ceppi di *Pseudomonas* posti in latte, a carico delle proteine contenute in questa particolare matrice alimentare, è stata utilizzata una metodica messa a punto nel 1979 da Adler-Nissen: il saggio TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid). Questo saggio ci permette di andare a stimare il grado di idrolisi proteica prendendo in considerazione gli aminoacidi liberi in soluzione

prodotti proprio dall'attività delle proteasi. Si tratta di un metodo spettrofotometrico dove viene rilevata la colorazione dovuta alla reazione tra il reagente 2,4,6-*trinitrobenzenesulfuric acid* con gli aminoacidi liberi in condizioni alcaline. La metodica nel corso degli anni ha subito numerose modifiche: nel 1964 Kotaki utilizzava β -mercaptoetanolo per prevenire l'aggregazione delle proteina mentre nel 1966 Habbeb introdusse l'uso di Sodio Dodecil Solfato (SDS) al fine di denaturare le proteine presenti nel campione, infine nel 1974 Burger introdusse l'utilizzo di *buffer* fosfati per l'alcalinazione del mezzo (Adler-Nissen, 1979). Tuttavia non è stato negli anni ancora definito un saggio TNBS preciso per la valutazione degli aminoacidi liberi nella soluzione. Per questo motivo, partendo dal protocollo stilato da Adler-Nissen, è stato messo a punto un saggio TNBS in grado di misurare il grado di idrolisi proteica in una matrice alimentare complessa come il latte, seguendo la procedura presente nello studio di Marchand e colleghi (Marchand et al., 2008).

2.8.1 Preparazione dei campioni

I campioni presi in esame sono 18 *Type Strains* riportati nella Tabella 7: tale scelta ha permesso dunque di valutare il potenziale alterante non relativo ad un unico sottogruppo del campionamento, ma di effettuare un efficace *screening* di tutte le specie del *taxon* oggetto di studio.

CEPPO	Codice di riferimento nello studio	Specie batterica
DSM17152T	DSM1	<i>Pseudomonas gessardii</i>
DSM15294T	DSM2	<i>Pseudomonas brenneri</i>
DSM17967T	DSM3	<i>Pseudomonas mandelii</i>
DSM17150T	DSM4	<i>Pseudomonas jessenii</i>
DSM16610T	DSM5	<i>Pseudomonas koreensis</i>
DSM17489T	DSM6	<i>Pseudomonas orientalis</i>
DSM18928T	DSM7	<i>Pseudomonas synxantha</i>
DSM18862T	DSM8	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
DSM6252T	DSM9	<i>Pseudomonas ludensis</i>
DSM14020T	DSM10	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>
DSM11331T	DSM11	<i>Pseudomonas veronii</i>
DSM17149T	DSM12	<i>Pseudomonas libanensis</i>
DSM50415	DSM13	<i>Pseudomonas lemonnierii</i>
CECT 124T	CECT1	<i>Pseudomonas corrugata</i>
CECT 229T	CECT2	<i>Pseudomonas marginalis</i>
CECT 378T	CECT3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CECT 446T	CECT4	<i>Pseudomonas fragi</i>
CECT 4470T	CECT5	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>

Tabella 7 La tabella illustra i ceppi presi in esame nel test TNBS, è stato riportato il nome di catalogo della ceppoteca, il codice conferitogli in laboratorio e il nome del ceppo.

I ceppi di referenza sono stati preinoculati nel brodo di coltura TSB (*Tryptic Soy Broth*) e posti a 22 °C per 3 giorni. Dopo un preinoculo singolo si è deciso di lavorare in triplicato. Sono stati quindi prelevati 100 µl di preinoculo e posti in 3 diversi tubi (Falcon) contenenti 10 ml di latte intero UHT acquistato dalla grande distribuzione. I tubi sono stati posti a 22 °C per 24 ore. Questa fase aveva la funzione di far adattare i batteri al nuovo terreno, il giorno successivo infatti sono stati prelevati da questa soluzione 100µl e sono stati posti in ulteriori 10ml di latte UHT, ponendo di nuovo le provette a 22 °C per 24 ore. A questo punto è stato fatto il primo prelievo di 25µl per effettuare il test TNBS, valutando così la proteolisi verificatasi nel latte dopo una fase di adattamenti di 24 ore alla temperatura considerata come optimum per *Pseudomonas fluorescens*, e il prelievo di 500 µl di latte per effettuare l'estrazione dell'RNA, per effettuare l'espressione genica del gene *aprX*. In seguito a questo

passaggio sono state effettuate cinque diluizioni seriali per ognuna delle tre repliche di tutti i campioni, arrivando ad una concentrazione finale di circa 10^3 CFU/ml. Queste provette sono state poi lasciate a 5 °C per 5 giorni, in modo da permettere a *Pseudomonas* di replicarsi e produrre proteasi termoresistenti e mimando così la presenza di una bassa carica di *Pseudomonas fluorescens* (10^3 CFU/ml) in campioni di latte UHT e conservati in frigorifero dal consumatore. Come controllo negativo nell'analisi è stato inoltre introdotto un "bianco" caratterizzato da latte non inoculato, sottoposto tuttavia a tutti gli *step* ai quali sono stati sottoposti i campioni. Dopo i 5 giorni rappresentati dalla fase di refrigerazione è stato effettuato il secondo prelievo di 25µl di soluzione per effettuare il test TNBS, con la finalità di testare la capacità proteolitica di una limitata carica di microorganismi alle basse temperature e un ulteriore prelievo di latte per la valutazione dell'espressione genica. A questo punto i campioni hanno subito un trattamento termico a 95 °C per 8 minuti e 45 secondi al fine di sterilizzare il latte ed eliminare *Pseudomonas*, ma allo stesso tempo in caso di produzione pregressa di proteasi termoresistenti, valutare la presenza di queste ultime. Infine, i campioni sono stati posti a 37 °C per due settimane, temperatura alla quale gli enzimi agiscono in maniera ottimale. Alla fine delle due settimane si è provveduto al terzo prelievo per poter effettuare il test TNBS, per valutare dunque il potenziale alterante delle proteasi prodotte precedentemente al trattamento termico, in assenza del batterio produttore.

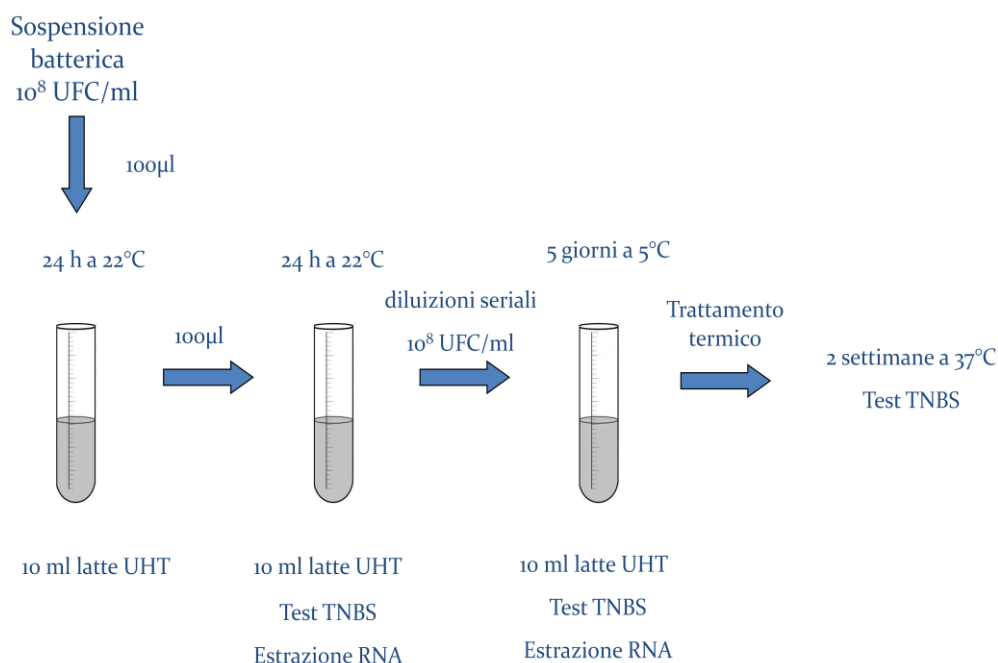


Figura 3 Nella figura sopra rappresentata è stato schematizzato l'esperimento sopra illustrato

2.8.2 Costruzione della retta di taratura

Per poter quantificare gli aminoacidi liberi nella soluzione è stato necessario costruire una retta di taratura utilizzando come *standard* l'aminoacido glicina. In questo modo è stato poi possibile confrontare la densità ottica misurata nei diversi momenti dell'esperimento, risalendo alla quantità di aminoacidi liberi. Sono stati così preparati dei campioni *standard* di glicina in SDS 1% alle seguenti concentrazioni: 2,25 mM, 2mM, 1,75 mM, 1,5 mM, 1,25 mM, 1 mM, 0,75 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0 mM. Sono stati in seguito prelevati 25 µl di tali *standard* e sono stati posti in 200 µl di Na_2HPO_4 0,2M tamponato a pH=8,2 mediante l'utilizzo di NaH_2PO_4 . A questo punto sono stati aggiunti 200 µl di TNBS ad ogni provetta. L'aggiunta del reagente viene effettuata dopo averlo diluito allo 0,1% partendo dallo stock avente concentrazione del 5% (Sigma-Aldrich). Le provette sono state così messe ad incubare al buio a 50 °C per 60 minuti per far avvenire la reazione. Quest'ultima è stata poi bloccata aggiungendo 400 µl di HCl 0,1N e, dopo aver lasciato riposare la reazione per 30 minuti è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro

ad una lunghezza d'onda di 420 nm. Per ogni replica biologica sono state create due repliche tecniche. Sono state così costruite tre rette di taratura: una per le letture effettuate prima della refrigerazione, una per le letture effettuate prima del trattamento termico (quindi dopo l'incubazione per 5 giorni a 5 °C) e una per le letture effettuate dopo il trattamento termico e la successiva incubazione di due settimane a 37 °C. Di particolare interesse è il valore di R_2 , ovvero il coefficiente di determinazione, un parametro usato per stabilire fino a che punto l'equazione di regressione può essere usata per trovare un valore x conoscendo il valore y . R_2 può assumere valori compresi tra 0 e 1: se $R_2 = 1$ esiste una perfetta relazione lineare fra x ed y , per cui ad un determinato valore di x ne corrisponde uno solo di y . Inoltre, attraverso la radice quadrata del coefficiente di determinazione, si ottiene il coefficiente di correlazione: $r = \sqrt{R_2}$. Il coefficiente di correlazione può assumere valori compresi tra -1 e +1; $r > 0,99$ è un indicatore di linearità.

2.8.3 Valutazione degli aminoacidi liberi

Dopo aver costruito la retta di taratura, si è proceduto con la determinazione del grado di idrolisi proteica nei campioni di interesse. Inizialmente sono stati prelevati 25 μ l di campione e sono stati posti in 200 μ l di SDS 1%, dopodiché sono stati prelevati da quest'ultima soluzione 25 μ l e sono stati posti in 200 μ l di sodio fosfato dibasico (Na_2HPO_4) tamponato a pH=8,2. Dopo aver aggiunto 200 μ l di TNBS 0,1%, i campioni sono stati incubati al buio a 50 °C per 60 minuti, dopodiché sono stati aggiunti 400 μ l di HCl 0,1N. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti ed è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 420 nm. I valori sono stati in seguito corretti sottraendo l'assorbanza del bianco.

2.9 Valutazione dell'espressione del gene *aprX*

2.9.1 Estrazione RNA

Per avere un riscontro biomolecolare oltre che biochimico, per 7 ceppi dei 18 *Type Strains* riportati nella Tabella 8, è stata effettuata l'estrazione

dell'RNA in due momenti antecedenti al trattamento termico. L'obiettivo era quello di valutare l'espressione genica di *aprX*, codificante la proteina termoresistente AprX, considerata la responsabile dell'alterazione dei prodotti lattiero-caseari dopo contaminazione di *Pseudomonas fluorescens*.

CEPPO	Codice di riferimento nello studio	Specie batterica
DSM17489T	DSM6	<i>Pseudomonasorientalis</i>
DSM6252T	DSM9	<i>Pseudomonasludensis</i>
DSM14020T	DSM10	<i>Pseudomonasrhodesiae</i>
DSM17149T	DSM12	<i>Pseudomonaslibanensis</i>
CECT 229T	CECT2	<i>Pseudomonasmarginalis</i>
CECT 378T	CECT3	<i>Pseudomonasfluorescens</i>
CECT 446T	CECT4	<i>Pseudomonasfragi</i>

Tabella 8 La tabella riporta la specie batterica, il nome del ceppo stoccato nella ceppo teca e il codice di riferimento in questo studio

L'estrazione dell'RNA è stata svolta mediante l'utilizzo dell'*RNeasy Tissue Mini Kit* (Qiagen). Il kit si basa sull'uso di colonnine di affinità che catturano l'RNA nel filtro e lasciano passare il resto della soluzione. Sono stati così prelevati 500 µl di latte ed è stata aggiunta una quantità di Buffer RLT pari a 700 µl al fine di effettuare la lisi batterica. Dopodichè sono stati aggiunti 7 µl di β-mercaptoetanololo, un composto in grado di rompere i ponti disolfuro delle proteine, favorendone così la denaturazione. Sono stati così aggiunti 250 µl di biglie di Zirconio ed il tutto è stato omogeneizzato nel ribolyzer (Hybaid) per 20 secondi alla velocità 5,5. Il tutto è stato agitato al vortex, centrifugato, dopodichè sono stati aggiunti 700 µl di etanolo al 70%, ed in seguito è stato passato il tutto in colonnine di affinità in grado di catturare l'RNA nel filtro lasciando passare il resto. Sono stati poi aggiunti 700 µl di Washing Buffer RW1 che ha permesso di effettuare dei lavaggi nel filtro, dopodichè è stato abbinato all'utilizzo delle colonnine l'uso della DNAsi al fine di eliminare le possibili molecole di DNA che possano essere state trattenute nel filtro. Come ultimo reagente è stato utilizzato l'Eluition

Buffer RPE, per favorire la successiva eluizione dell'acido nucleico. Ad ogni passaggio è stata effettuata una centrifugazione ad alta velocità e, dopo aver posto la colonnina in una provetta pulita, l'RNA è stato eluito in 30µl di acqua *RNAsi free*. In seguito all'estrazione, l'RNA è stato prima quantificato mediante l'utilizzo dello strumento *microdrop* (ThermoScientific-MultiskanGo), che ha permesso di avere anche dei dati qualitativi, ed in seguito retroscritto. Il *microdrop* ha permesso la valutazione della quantità e della qualità dell'RNA estratto mediante una tecnica spettrofotometrica, ovvero misurando l'assorbimento di 2,5 µl di RNA a 230 nm, 260 nm e 280 nm. La concentrazione dell'estratto è stata ottenuta dapprima sottraendo dalla Densità Ottica (O.D.) misurata per ogni campione quella misurata per l'acqua BDH, dopodichè si è applicata la seguente formula:

$$\text{concentrazione} \left(\frac{\text{ng}}{\text{ul}} \right) = \text{Abs}_{260} * 40 * (10/0.52)$$

Dopo aver corretto i valori di O.D. a 230 e 280 nm per tutti i campioni, è stata anche effettuata la valutazione della qualità degli estratti valutando i rapporti 260/230 e 260/280. Un'ottima qualità dell'estratto è rappresentata da rapporti vicini o pari a 2; valori distanti da tale optimum sono dovuti dalla presenza di proteine o sali che possono interferire con le successive fasi di analisi.

2.9.2 Retrotrascrizione dell'RNA

La retrotrascrizione ha il fine di ottenere il cDNA che possa essere utilizzato per le analisi successive. La retrotrascrizione è un passaggio fondamentale poiché ci permette di ottenere un acido nucleico a doppio filamento, più resistente dell'RNA e quindi più conservabile e manipolabile. La reazione di retrotrascrizione è stata eseguita utilizzando il kit *Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)*. Il protocollo è stato applicato ad ogni campione in duplicato, ad uno dei quali non è stato aggiunto l'enzima *SuperScript II RT* (retrotrascrittasi) in maniera tale che, se ci fosse contaminazione da DNA nel campione di partenza questa potesse essere rilevata tramite successive analisi. Sono stati così

aggiunti a 10 μ l di ogni campione di RNA estratto 2 μ L di mix1 costituita da:

- 1 μ l di *random primers* (Euroclone)
- 1 μ l dNTPs mix (10 mM)

Le provette sono state poi incubate in termociclatore a 65 °C per 5 minuti e poi poste in ghiaccio per 2 minuti. Ad ogni campione sono stati aggiunti 7 μ l di mix2 composta da:

- 4 μ l First-Strand Buffer (5X)
- 2 μ l DTT (0.1M)
- 1 μ lRNaseOUT (40 U/ μ l).

È stata poi eseguita un'incubazione di 2 minuti a 25 °C. Ad ogni campione RT è stato aggiunto 1 μ l di *SuperScript II RT* (200 U/ μ l), mentre nessuna aggiunta è stata effettuata per i campioni di controllo (noRT). Le provette sono state incubate a 25 °C per 10 minuti e successivamente a 42 °C per 50 minuti. La reazione è stata inattivata con riscaldamento a 70 °C per 15 minuti. I campioni sono stati poi conservati a -20 °C fino alle successive analisi.

2.9.3 PCR *end-point* su cDNA

Al fine di valutare l'espressione del gene *aprX* nei ceppi posti in latte nelle due diverse condizioni, è stata effettuata una reazione di PCR *end-point* sui cDNA ottenuti precedentemente. È stata così effettuata una analisi qualitativa basata sulla presenza/assenza della banda in seguito alla corsa elettroforetica dei campioni amplificati. Al fine di valutare la buona riuscita del processo di retrotrascrizione e quindi non incorrere in possibili falsi negativi è stata effettuata una PCR in parallelo sul gene *housekeepin grpoD*. I *primer* utilizzati per l'amplificazione del gene *aprX* e del gene *rpoD* sono stati disegnati in un precedente studio presso il laboratorio della Dott.ssa Barbara Cardazzo e sono riportati nella Tabella 9.

<i>Primer</i>	Sequenza	Dimensioni amplicone	<i>T_m</i> (°C)
<i>aprX</i>	CAGACCCTGACCCACGARATCGG (23) TGAGGTTGATCTTCTGGTTCTGGG (24)	710 pb	66,9 62,7
<i>rpoD</i>	CTGATCCAGGAAGGCAACATCGG(23) ACTCGTCGAGGAAGGAGCG(19)	631 pb	64,5 65,6

Tabella 9 Primer utilizzati per l'amplificazione dei geni *aprX* e *rpoD*

La mix utilizzata per questa reazione è la medesima riportata nella Tabella 5, mentre il ciclo termico è descritto nella Tabella 6. La valutazione delle bande relative all'amplificato dei loci di *aprX* e *rpoD* è stata effettuata in gel d'agarosio come precedentemente descritto nel paragrafo 2.4.

2.10 Test dell'azocaseina in ricotta

Al fine di valutare il potenziale proteolitico di specifici ceppi di *Pseudomonas* in un ulteriore prodotto lattiero caseario, quale la ricotta, è stato effettuato il test dell'azocaseina. L'azocaseina è una caseina coniugata con un colorante azoico, la cui degradazione porta alla liberazione del pigmento. Ciò può essere rilevato con un'analisi quantitativa mediante misurazioni spettrofotometriche. Questa ci permette così di valutare l'attività proteolitica dovuta all'attività delle proteasi, AprX in primis, sul substrato messo a disposizione. I ceppi utilizzati in questa fase dello studio sono i medesimi per i quali è stata effettuata la valutazione dell'espressione del gene *aprX* e sono riportati nella Tabella 10.

CEPPO	Codice di riferimento nello studio	Specie batterica
DSM17489T	DSM6	<i>Pseudomonas orientalis</i>
DSM6252T	DSM9	<i>Pseudomonas ludensis</i>
DSM14020T	DSM10	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>
DSM17149T	DSM12	<i>Pseudomonas libanensis</i>
CECT 229T	CECT2	<i>Pseudomonas marginalis</i>
CECT 378T	CECT3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CECT 446T	CECT4	<i>Pseudomonas fragi</i>

Tabella 10 La tabella riporta i ceppi utilizzati per il test dell'azocaseina.

In questo test sono state analizzate ricotte acquistate dalla grande distribuzione, inoculate con 1 ml di preinoculo di ceppi di *Pseudomonas* con carica di 10^8 UFC/ml che sono state poi incubate a 5 °C per una settimana. In questo modo si è mimata la contaminazione ad opera di microorganismi in un prodotto finito, conservato alla temperatura di refrigerazione. Sono stati pesati 1 grammo di ricotta e sono stati aggiunti 5ml di *Buffer* PBS (*Phosphate buffered saline* - Life Technologies) avente la seguente composizione:

- NaCl alla concentrazione di 8,0 g/l
- KCl alla concentrazione di 0,2 g/l
- Na₂HPO₄ alla concentrazione di 1,44 g/l
- KH₂PO₄ alla concentrazione di 0,24 g/l

Dopo aver agitato al vortex le provette per rendere la soluzione più omogenea possibile, queste sono state centrifugate a 13.500 rpm per 5 minuti, a questo punto il surnatante è stato trasferito in una provetta pulita e da qui sono stati prelevati 50 µl per effettuare il test. Come controlli negativi sono stati utilizzati un campione rappresentato da solo *buffer* ed un campione rappresentato da *buffer* e ricotta non inoculata. A questo punto ad ogni campione sono stati aggiunti 125 µl di azocaseina (5mg/ml) e sono stati incubati a 37 °C *overnight* per permettere la reazione. Al fine di stoppare il processo di idrolisi sono stati aggiunti 50 µl di acido tricloroacetico (TCA). Il tutto è stato centrifugato a 13.500 rpm per 5 minuti, prelevato il surnatante ed aggiunti 100 µl di NaOH in

maniera da stabilizzare la reazione. A questo punto i campioni sono stati letti allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 450 nm.

2.11 Screening per la presenza del gene *aprX*

Poiché da uno studio precedente è stata dimostrata la presenza del gene *aprX* in tutti i ceppi di referenza oggetto di questo studio, è stato effettuato uno screening dei ceppi di campo, con la finalità di valutare la diffusione di tale gene tra i microrganismi del gruppo *Pseudomonas fluorescens*. Dopo aver estratto il DNA da tutti i campioni di campo come riportato nel paragrafo 2.3.1, questi sono stati diluiti 1:100 e sottoposti ad una reazione di PCR *end-point* al fine di valutare la presenza/assenza del gene *aprX*. Sono stati utilizzati *primer* specifici per il gene *aprX* ed è stata effettuata in parallelo una reazione di PCR sul gene *housekeeping rpoD* (entrambi già riportati nella Tabella 9) al fine di valutare la corretta estrazione del DNA e quindi evitare di ottenere falsi negativi. La mix utilizzata per la reazione è la medesima descritta nella Tabella 5 ed il ciclo termico è il medesimo descritto nella Tabella 6. È stata effettuata una corsa elettroforetica sui campioni amplificati al fine di valutare la presenza del gene. Le condizioni utilizzate per preparare il gel e quelle della corsa elettroforetica sono le stesse descritte nel paragrafo 2.4.

3. RISULTATI

3.1 Valutazione di caratteri fenotipici dei ceppi di campo di *Pseudomonas fluorescens*

I ceppi di campo, elencati in Tabella 11, sono stati sottoposti ad indagine fenotipica al fine di valutare l'effettiva appartenenza al gruppo *Pseudomonas* la capacità di produrre il pigmento blu. Dai risultati fenotipici ottenuti, è risultato che tutti i ceppi di campo analizzati sono cresciuti su PAB-CFC, mentre tutti tranne il ceppo 811/1 hanno prodotto il tipico pigmento blu scuro se fatti crescere su PDA.

Ceppo	Crescita in CFC PAB	Produzione pigmento in PDA
SAL1	+	+
BU3	+	+
PCA3	+	+
EL1	+	+
ML1	+	+
811/2	+	+
811/1	+	-

Tabella 11: caratterizzazione fenotipica dei ceppi effettuata mediante valutazione della crescita in PAB e della produzione di pigmento in PDA.



Figura 4 La figura rappresenta la crescita di ceppi su PAB



Figura 5 La figura riporta la crescita di *Pseudomonas* su terreno PDA con produzione del pigmento blu

3.2 *MultiLocusSequence Typing*

3.2.1 Amplificazione dei loci *glnS*, *gyrB*, *ileS*, *nuoD*, *recA*, *rpoB*, *rpoD*

Per effettuare una genotipizzazione di *Pseudomonas* a livello di ceppo sono stati amplificati sette geni *housekeeping*, attuando la tecnica del *MultiLocu sSequence Typing*. L'amplificazione dei loci *glnS*, *gyrB*, *ileS*,

nuoD, *recA*, *rpoB* e *rpoD* è avvenuta correttamente per tutti e sette i nuovi ceppi testati in laboratorio senza apportare alcuna modifica al protocollo termico, come attestato dalla valutazione della qualità degli amplificati. La corsa in gel d'agarosio ha confermato che tutti i ceppi presentavano una banda della dimensione attesa, mentre non sono state rilevate bande doppie, dovute alla presenza di aspecifici.

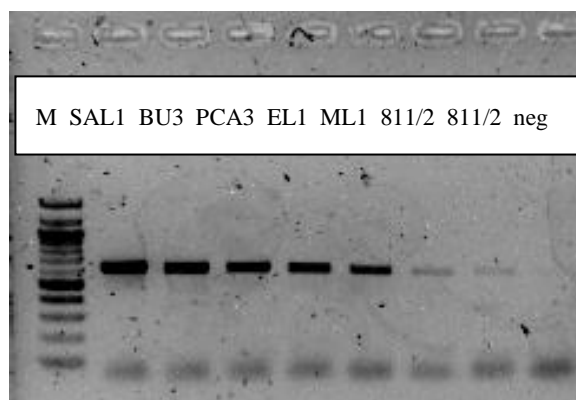


Figura 6 La figura riporta la corsa elettroforetica degli amplificati del locus *rpoD* dei ceppi presi in esame in questo studio

3.2.2 Sequenziamento dei prodotti di PCR

Il sequenziamento delle regioni amplificate è stato effettuato correttamente. Tutti i cromatogrammi presentavano picchi univoci che ci hanno permesso di distinguere chiaramente i differenti nucleotidi facenti parte della sequenza. Si sono così ottenute delle sequenze in formato FASTA necessarie per analisi successive.

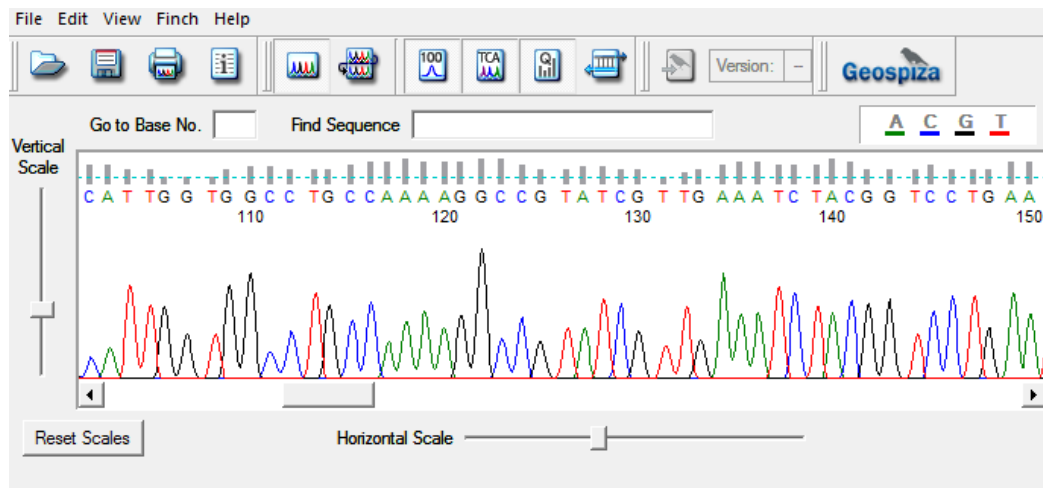


Figura 7 La figura riporta il cromatogramma del gene *rpoD* del ceppo BU3

Tutte le regioni sequenziate con il *primer forward* sono state confermate con le regioni provenienti dal sequenziamento con il *primer reverse*, dopo allineamento mediante il *software* ClustalW.

3.2.3 Identificazione degli alleli e dei *SequenceType*

Dopo aver analizzato i cromatogrammi ed allineato le sequenze, per ogni *locus* analizzato sono stati identificati una serie di varianti alleliche, utilizzando il *software* DataMonkey. Oltre ai ceppi oggetto di questo studio e quelli del precedente campionamento, sono state analizzate le sequenze di ciascun *locus* di 6 genomi completamente sequenziati di *Pseudomonas fluorescens* presenti in GenBank. La totalità degli alleli rilevati è stata riportata nella Tabella 12,

	<i>glnS</i>	<i>gyrB</i>	<i>ileS</i>	<i>nuoD</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoD</i>	ST
SBW25	1	1	1	1	1	1	1	1
Pf0-1	2	2	2	2	2	2	2	2
pf5	3	3	3	3	3	3	3	3
pbrassicacearum	4	4	4	4	4	4	4	4
A506	5	5	5	5	5	5	5	5
F113	6	6	6	6	6	6	6	6
DSM17152T	7	7	7	7	7	7	7	7
DSM15294T	8	8	8	8	8	8	8	8
DSM17967T	9	9	9	9	9	9	9	9
DSM17150T	10	10	10	10	10	10	10	10
DSM16610T	11	11	11	11	11	11	11	11
DSM17489T	12	12	12	12	12	12	12	12
DSM18928T	13	13	13	13	13	13	13	13
DSM18862T	14	14	14	14	14	14	14	14
DSM6252T	15	15	15	15	15	15	15	15
DSM14020T	16	16	16	16	16	16	16	16
DSM11331T	17	17	17	17	17	17	17	17
DSM17149T	18	18	18	18	18	18	18	18
DSM50415	19	19	19	19	19	19	19	19
CECT124T	20	20	20	20	20	20	20	20
CECT229T	21	21	21	21	21	21	21	21
CECT378T	22	22	22	22	22	22	22	22
CECT446T	23	23	23	23	23	23	23	23
CECT4470T	24	24	24	24	24	24	24	24
pf_1	25	25	25	25	25	25	25	25
pf_2	26	26	26	26	26	26	26	26
pf_3	27	27	27	27	27	27	27	27
pf_4	28	28	28	28	28	28	28	28
pf_5	29	29	29	29	29	29	29	29
pf_6	30	30	30	30	26	30	30	30
pf_7	31	31	31	31	30	31	31	31
pf_8	28	32	28	32	28	28	28	32
pf_9	32	33	32	33	31	32	32	33
pf_10	32	34	33	34	31	32	32	34
pf_11	21	35	34	35	21	33	21	35
pf_12	33	36	35	36	32	34	32	36
pf_13	34	37	36	37	33	35	33	37
pf_14	35	38	37	38	34	36	31	38
pf_15	36	17	38	39	35	37	17	39
pf_16	37	39	39	40	36	38	34	40
pf_17	38	40	40	41	37	39	35	41
pf_18	39	41	41	42	38	40	36	42
pf_19	40	42	42	43	39	41	37	43
pf_20	41	30	43	44	40	30	38	44
pf_21	42	43	44	45	41	42	39	45
pf_22	43	44	45	46	26	43	30	46

pf_23	44	45	46	47	42	44	40	47
pf_24	45	46	47	48	43	45	41	48
pf_25	46	26	48	49	26	30	42	49
pf_26	47	47	49	50	44	46	43	50
pf_27	48	41	50	42	45	47	44	51
pf_28	49	48	51	51	46	48	45	52
pf_29	50	49	52	52	47	49	46	53
pf_30	51	50	53	53	48	50	47	54
pf_31	50	51	54	54	49	51	48	55
pf_32	52	52	55	55	50	52	49	56
pf_33	53	53	56	56	51	53	50	57
pf_34	50	54	52	52	52	49	46	58
pf_35	54	51	54	54	49	51	48	59
pf_36	55	52	57	57	53	54	51	60
pf_37	56	55	58	58	54	48	52	61
pf_38	56	56	59	58	3	55	3	62
pf_39	57	57	60	59	21	21	21	63
pf_40	58	58	30	60	55	56	53	64
pf_41	59	59	61	61	56	57	54	65
pf_42	60	60	62	62	57	58	55	66
pf_43	61	61	63	63	58	59	56	67
pf_44	62	62	64	64	59	58	55	68
pf_45	63	63	15	65	60	60	15	69
pf_46	60	64	65	66	61	58	57	70
pf_47	64	23	66	67	62	23	58	71
pf_48	62	60	64	66	63	58	59	72
pf_49	65	27	67	68	64	27	27	73
pf_50	66	60	62	66	65	58	59	74
pf_51	67	65	68	69	66	61	3	75
pf_52	68	66	69	70	67	62	43	76
pf_53	62	62	64	70	59	58	55	77
pf_54	60	67	70	71	68	58	60	78
pf_55	69	68	71	72	69	63	61	79
pf_56	70	69	72	73	70	64	62	80
pf_57	39	41	73	42	38	65	36	81
pf_58	71	70	74	74	71	66	63	82
pf_59	72	71	75	75	72	67	64	83
pf_60	73	70		76	73	68	65	
pf_61	74	25	76	77	74	69	25	84
pf_62	75	72		78	75	70	66	
pf_63	76	73		79	76	71	67	
pf_64	77	74	77	80	77	72	68	85
pf_65	78	75	78	81	78	73	45	86
pf_66	79	76	77	82	79	64	69	87
pf_67	80	77	79	83	80	66	70	88
pf_68	81	70	80	74	81	74	71	89
pf_69	82	78	81	84	9	75	72	90

pf_70	83	79	82	85	82	76	73	91
pf_71	84	80	83	86	83	77	74	92
pf_72	85	81	84	87	84	78	75	93
pf_73	86	82	85	88	85	79	76	94
pf_74	62	83	86	62	63	58	59	95
pf_75	29	29	29	29	29	29	29	29
pf_76	26	26	26	26	26	26	26	26
pf_77	87	5	5	89	86	80	77	96
pf_78	88	26	87	44	26	81	78	97
pf_79	89	5	5	90	86	82	5	98
SAL1	34	37	88	37	33	35	33	99
BU3	90	84	29	29	29	29	29	100
PCA3	34	37	36	37	33	35	33	37
EL1	91	85	43	91	26	83	79	101
ML1	92	5	5	92	86	82	78	102
811/2	93	25	89	93	87	69	25	103
811/1	94	27	90	94	64	84	27	104

Tabella 12 La tabella riporta il numero delle varianti alleliche dei sette geni presi in esame ed gli ST di ogni ceppo

La numerosità allelica oscilla tra 94 di *glnS* e *nuoD* e 79 di *rpoD*, con l'identificazione di 104 diversi ST per un totale di 110 ceppi presi in esame. È possibile notare che il ceppo SAL1 condivide 6 loci su 7 (*glnS*, *gyrB*, *nuoD*, *recA*, *rpoB* e *rpoD*) con il ceppo pf_13, BU3 condivide 5 loci (*ileS*, *nuoD*, *recA*, *rpoB* e *rpoD*) con pf_5, PCA3 ha lo stesso ST di pf_13 nonostante sia stato isolato da differenti matrici (il primo da burro ed il secondo da mozzarella), ML1 condivide i loci *gyrB* e *ileS* con A506, 811/2 condivide i loci *gyrB* e *rpoD* con pf_1 e 811/1 condivide i loci *gyrB* e *rpoD* con pf_3.

3.3 DNAsp per valutare la variabilità genetica

Mediante il *software* DnaSP sono stati messi in evidenza alcuni parametri relativi a ciascuno dei *loci* genici e al concatenamento, come ad esempio la percentuale di G-C, il numero di polimorfismi e dei siti informativi della parsimonia, il tasso di mutazioni sinonime e non sinonime, il valore D del test di Tajima e i valori Θ (numero medio di differenze nucleotidiche per sito) e π (diversità nucleotidica per sito). I risultati sono stati sintetizzati nella Tabella 13.

Locus o sequenze concatenate per cluster	Dimensione frammento (bp)	N alleli	Contenuto G-C	N siti polimorfici	N siti informativi della parsimonia	Mutazioni sinonime	Mutazioni non sinonime	Tajima's D test	Θ	π
<i>glnS</i>	501	94	0,4263	215	203	159	18	1	0,081	0,105
<i>gyrB</i>	492	85	0,3875	190	173	204	13	1,52	0,073	0,107
<i>ileS</i>	552	90	0,4104	224	197	175	27	0,886	0,077	0,097
<i>nuoD</i>	600	94	0,4291	186	156	150	15	0,868	0,067	0,085
<i>recA</i>	435	87	0,4208	160	147	195	10	1,413	0,069	0,099
<i>rpoB</i>	477	84	0,3993	158	140	134	12	0,285	0,062	0,067
<i>rpoD</i>	480	79	0,3909	109	90	137	4	0,077	0,042	0,043
Concatenamero	3537	105	0,4083	1205	1044	525	510	0,347	0,084	0,093

Tabella 13 La tabella riporta alcuni parametri relativi a ciascuno dei *loci* genici e al concatenamero.

Il contenuto di G-C varia tra 0,387 (*gyrB*) e 0,429 (*nuoD*), il numero di siti polimorfici varia da 109 (*rpoD*) a 224 (*ileS*) e le mutazioni sinonime variano da 134 (*rpoB*) a 204 (*gyrB*). Il valore D del test di Tajima è stato utilizzato per testare se l'evoluzione molecolare fosse dovuta a processi casuali che portano alla sostituzione di un allele neutrale con un altro allele equivalente dal punto di vista funzionale. In questo caso il valore del *D-test* varia da 1,413 (*recA*) a 0,868 (*rpoD*), supportando una selezione di tipo neutrale come atteso, dato l'utilizzo di soli geni *housekeeping* per lo svolgimento dell'analisi. Infine, la differenza nucleotidica (π) calcolata per i diversi *loci* oscilla tra 0,043 (*rpoD*) e 0,107 (*gyrB*), mentre il valore Θ varia da 0,042 (*rpoD*) a 0,081 (*glnS*).

3.4 Analisi filogenetiche mediante il software PhyML

Dall'allineamento ottenuto dai concatenamenti dei 79 ceppi più i nuovi 7 ceppi arrivati in laboratorio è stato creato un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* al fine di individuare la parentela genetica tra i ceppi. L'albero filogenetico è stato ottenuto utilizzando il software online PhyML. Dalla visualizzazione dell'albero, rappresentato in Figura 8 si può notare come vi sia la presenza di due specifici macroraggruppamenti: un primo gruppo *P. fragi* (contenente i *TypeStains* CECT446T e DSM6252T) e un secondo gruppo che è stato a sua volta suddiviso in cinque sottogruppi:

- sottogruppo *P. jesseni*;
- sottogruppo *P. corrugata*;
- sottogruppo *P. koreensis* (contenente DSM50415 e DSM17967T);
- sottogruppo *P. chlororaphis*;
- sottogruppo *P. fluorescens* (contenente DSM14020T, DSM15294T, DSM17152T, DSM11331T, DSM18862T, CECT378T, CECT229T, DSM18928T, DSM17149T e DSM17489T).

Tutti i nuovi ceppi blu sono contenuti nel cosiddetto "blue branch" precedentemente identificato nel lavoro Andreani et al., 2014; mentre il ceppo bianco 811/1 cade nel gruppo *P. fragi*. La quasi totalità dei rami è supportata da valori sostanzialmente alti.

3.5 TNBS

Al fine di testare il grado di proteolisi delle proteine del latte ad opera dei ceppi di *Pseudomonas* è stato effettuato il test TNBS, tramite il quale siamo stati in grado di quantificare gli aminoacidi liberi nella soluzione.

3.5.1 Costruzione della retta di taratura

Per standardizzare i valori di assorbanza ottenuti per le tre differenti misurazioni è stata creata per ogni misurazione una retta di taratura. Grazie alla retta è stato possibile ottenere l'equazione presente nella figura sottostante e quindi risalire alle concentrazioni di aminoacidi liberi presenti nei campioni.

Le rette presentano valori sovrapponibili, con coefficienti di determinazione molto vicini al valore 1. Nel caso della retta presa come esempio e riportata nella Figura 9 si può notare come il coefficiente sia uguale a 0,995.

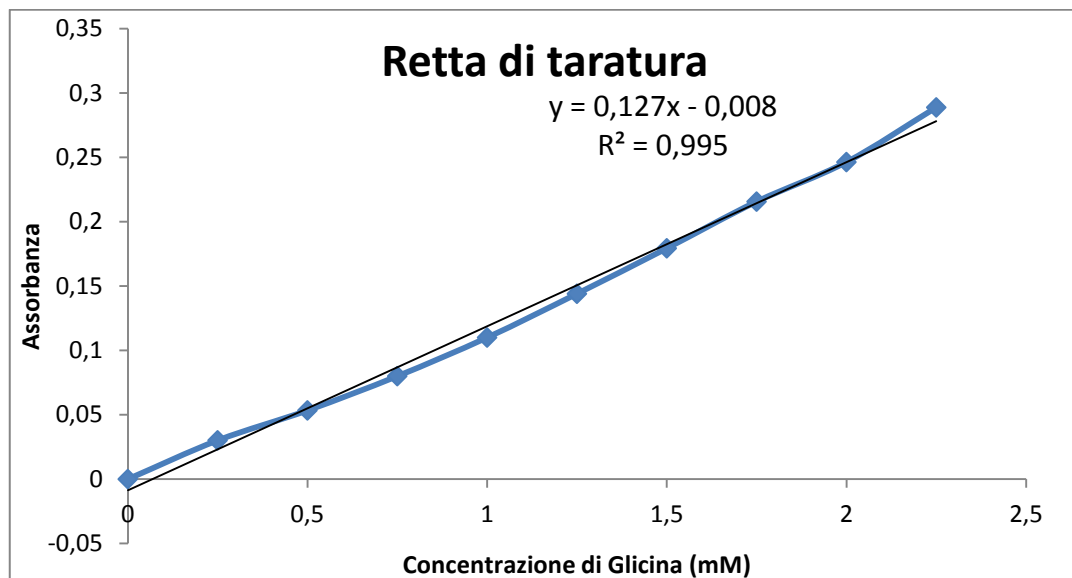


Figura 9 La figura riporta la retta di taratura ottenuta da una delle misurazioni del TNBS

3.5.2 Saggio TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) per la valutazione della capacità proteolitica di ceppi *Type Strains*

È stato effettuato il test TNBS su 18 ceppi *Type Strains* (vedi Tabella 7) al fine di andare a valutare l'attività proteolitica di questi ceppi all'interno della matrice latte. Nelle immagini sotto riportate sono riassunti i risultati ottenuti dalla lettura spettrofotometrica al ThermoScientific-MultiskanGo. Per ogni ceppo, testato in

triplicato, sono stati effettuati due letture spettrofotometriche ed è stata effettuata la media dei valori ottenuti con le rispettive deviazioni standard per ottenere un maggior supporto dal punto di vista statistico. Sotto è riportata un'immagine che riassume l'attività proteolitica dei 18 ceppi analizzati.

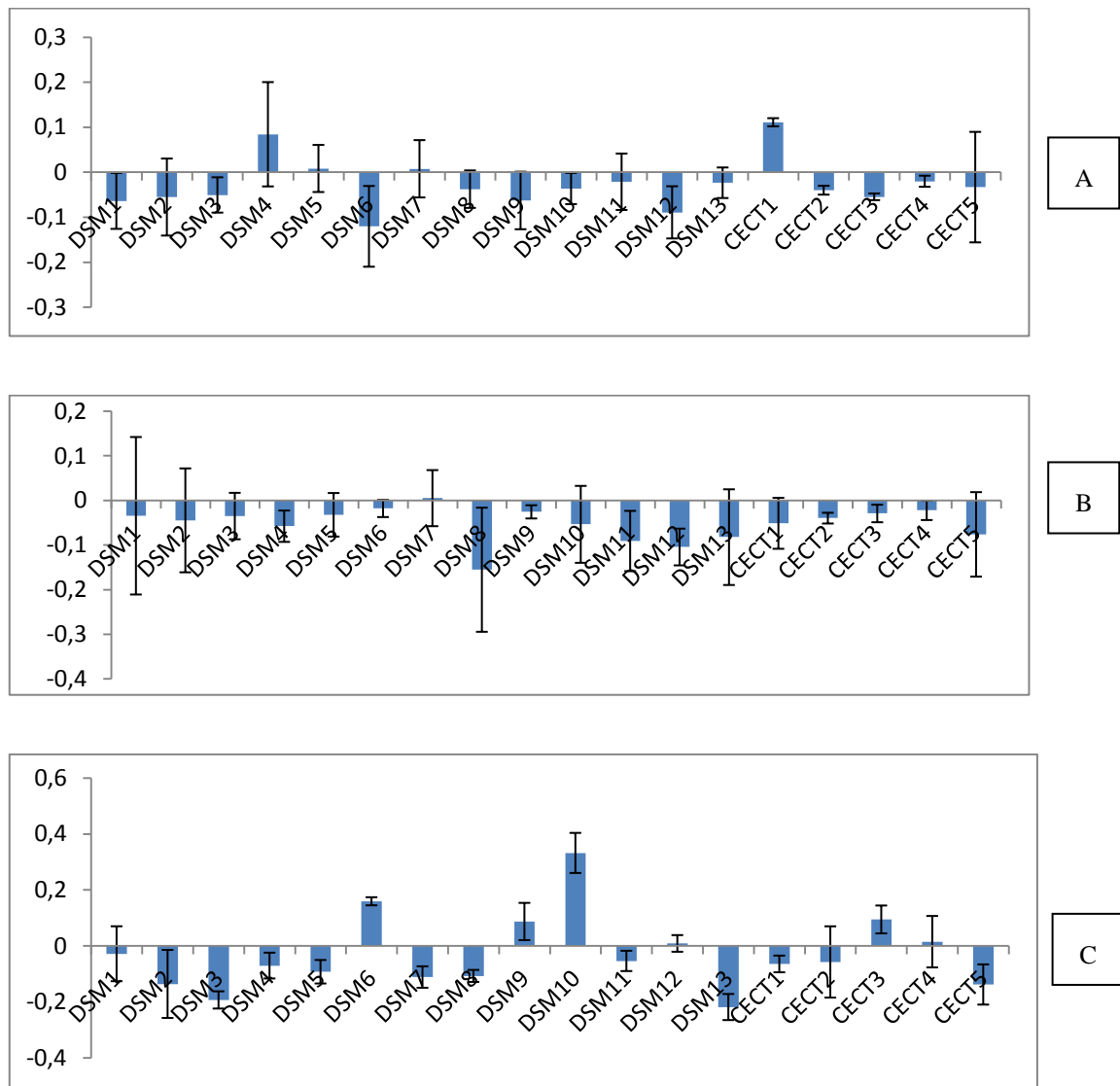
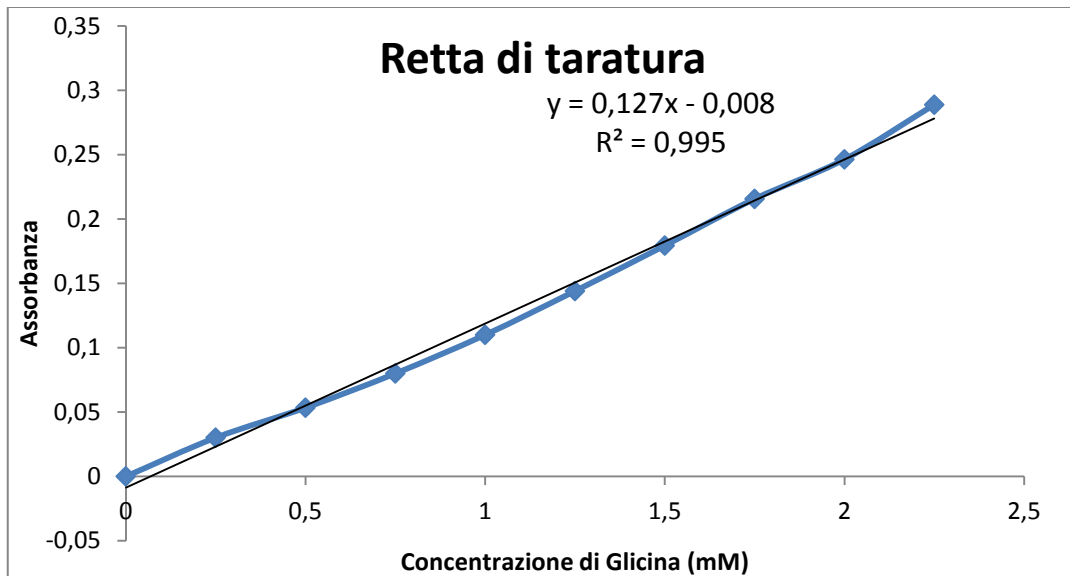


Figura 10 La figura riporta i risultati del saggio TNBS in tre momenti e condizioni differenti A) Misura spettrofotometrica dopo 48h a 22 °C B) Misura spettrofotometrica dopo 5 giorni a 5 °C C) Misura spettrofotometrica dopo due settimane a 37 °C)

Si può notare come dopo 48h a 22 °C tutti i ceppi siano praticamente negativi, abbiamo una leggera ma trascurabile positività dei ceppi CECT1 e DSM4.

Dopo un'incubazione a 5 °C per 5 giorni si può notare che nessun ceppo presenta attività proteolitica. Dalle misurazioni dopo due settimane a 37 °C si può notare come ci siano quattro ceppi (DSM6, DSM9, DSM10 e CECT3) che presentano

positività Mediante l'utilizzo della retta di taratura è stato possibile ottenere le concentrazioni reali degli aminoacidi liberi sostituendo i valori dell'assorbanza all'equazione della retta. Dato che i campioni analizzati sono stati diluiti 9 volte in più rispetto agli standard di glicina siamo andati a moltiplicare i valori dei campioni per nove. Nella Tabella 14 si possono apprezzare le concentrazioni reali di aminoacidi liberi riscontrati nei ceppi risultati positivi al test.



Ceppo	Abs (420nm)	Concentrazione reale (mM)
DSM6	0,159223	11,85047244
DSM9	0,086953	6,728976378
DSM10	0,331995	24,09413386
CECT3	0,094301	7,249724409

Tabella 14 Questa tabella riporta i valori reali della concentrazione di aminoacidi libero nella soluzione

3.5.3 Studio di espressione genica

Un precedente studio svolto in laboratorio ha dimostrato la presenza del gene *aprX* in tutti i 18 ceppi di riferimento utilizzati in questa tesi. Tuttavia il saggio TNBS ha dimostrato una notevole variabilità nell'attività proteasica. Quindi per

avere un riscontro biomolecolare da associare all'analisi fenotipica l'RNA è stato estratto da 7 ceppi di riferimento (riportati in Tabella 8). Per ciascun ceppo l'RNA è stato estratto in due condizioni: dopo le 24h di crescita a 22°C in latte e dopo la permanenza per 5 giorni a 5°C (punti in corrispondenza dei saggi TNBS1 e 2). L'RNA una volta retroscritto come descritto nel paragrafo 2.9.2, è stato utilizzato per valutare l'espressione genica di *aprX* mediante PCR *end-point* e seguente corsa elettroforetica.

3.5.4 Saggio dell'Azocaseina

Un metodo alternativo al test TNBS per la valutazione dell'attività proteolitica di ceppi batterici è il test dell'azocaseina, questo ha permesso di valutare la capacità proteolitica su una matrice lattiero casearia fresca e ricca di proteine, la ricotta. Il saggio è stato effettuato utilizzando i 7 ceppi per i quali è stato effettuato lo studio di espressione. Sono state effettuate 4 repliche tecniche nella lettura spettrofotometrica. Nella Figura 11 sono riportati i risultati ottenuti dal test.

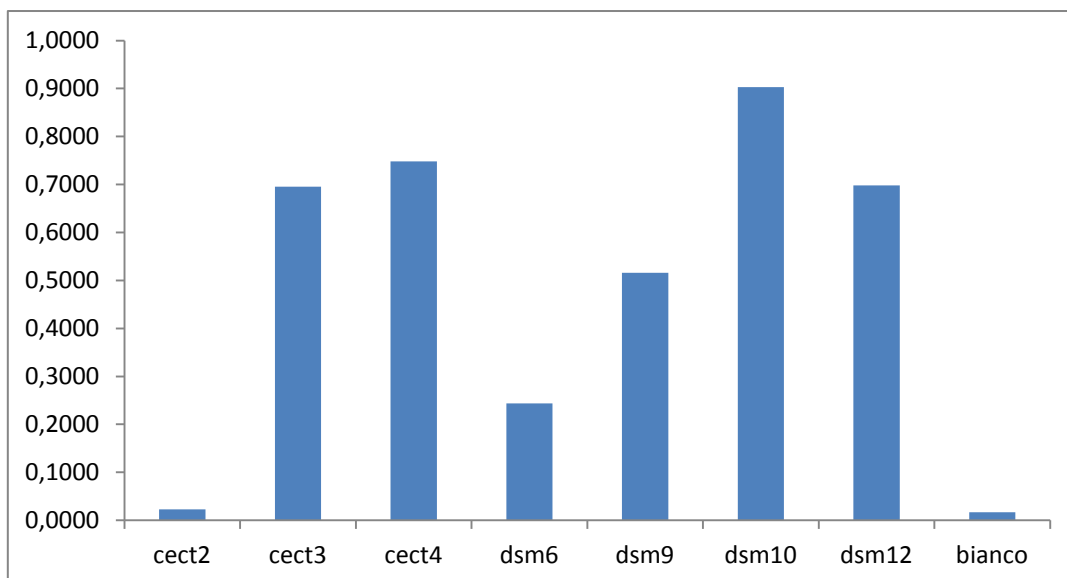


Figura 11 La figura riporta i risultati inerenti all'attività proteolitica dei ceppi presi in esame ottenuti mediante il test dell'azocaseina

Si può notare, prendendo come punto di riferimento il bianco, tutti i ceppi hanno attività proteolitica ad eccezione del ceppo CECT2 che presenta una trascurabile attività proteolitica.

3.5.5 Valutazione comparativa dell'attività proteolitica di ceppi *Type Strains*

È stata creata una tabella riassuntiva in cui sono riportati tutti i dati ottenuti dalle varie analisi effettuate al fine di studiare l'attività proteolitica dei ceppi *Type Strains*, in maniera da presentare un quadro generale su ogni ceppo *Type Strains* preso in esame. Nella tabella i dati ottenuti dalle repliche sono stati accorpati in un unico dato nel momento in cui questi erano tra di loro concordi.

CEPPI			espressione genica (estrazione RNA)		test del TNBS			azocaseina
			1 (22 ° C)	2 (5 ° C)	1 (22 ° C)	2 (5 ° C)	3 (37 ° C)	
DSM 1	DSM 17152T	<i>P.gessardii</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 2	DSM 15294T	<i>P.brenneri</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 3	DSM 17967T	<i>P.mandelii</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 4	DSM 17150T	<i>P.jessenii</i>	n.d.	n.d.	+	-	-	n.d.
DSM 5	DSM 16610T	<i>P.koreensis</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 6	DSM 17489T	<i>P.orientalis</i>	+	+	-	-	+	+
DSM 7	DSM 18928T	<i>P.synxantha</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 8	DSM 18862T	<i>P.azotoformans</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 9	DSM 6252T	<i>P.lundensis</i>	-	-	-	-	+	+
DSM 10	DSM 14020T	<i>P.rhodesiae</i>	+	-	-	-	+	+
DSM 11	DSM 11331T	<i>P.veronii</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
DSM 12	DSM 17149T	<i>P.libanensis</i>	+	-	-	-	-	+
DSM 13	DSM50415	<i>P. lemonnieri</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.
CECT1	CECT124T	<i>P.corrugata</i>	n.d.	n.d.	+	-	-	n.d.
CECT2	CECT229T	<i>P.marginalis</i>	-	-	-	-	-	-
CECT3	CECT378T	<i>P.fluorescens</i>	+	-	-	-	+	+
CECT4	CECT446T	<i>P.fragi</i>	+	-	-	-	-	+
CECT5	CECT4470T	<i>P.chlororaphis</i>	n.d.	n.d.	-	-	-	n.d.

Tabella 15 La tabella riassume i risultati inerenti all'analisi dell'mRNA del gene *aprX*, del test TNBS e del test dell'azocaseina

Dai dati riportati si nota che alla temperatura di 22 °C cinque ceppi su sette non presentano risultati concordanti per quanto riguarda la valutazione biomolecolare e biochimica, mentre alla temperatura di 5 °C tutti i ceppi tranne uno (DSM6) presentano concordanza tra dati biomolecolari e biochimici. Dei sette ceppi solo due di questi non hanno presentato attività proteolitica su ricotta.

3.5.6 Screening sulla presenza/assenza del gene *aprX*

I ceppi elencati in Tabella 3 sono stati sottoposti ad analisi per verificare la prevalenza del gene *aprX* nei ceppi di campo. I ceppi sono stati rivitalizzati e il DNA è stato estratto come descritto nel paragrafo 2.3.1 dei materiali e metodi. È stata quindi allestita una PCR *end-point* di screening per il gene *aprX*, come descritto nel paragrafo 2.3.3. Il risultato, schematizzato in Figura 12 dimostra che la maggior parte dei ceppi di campo contengono nel loro genoma almeno una copia del gene *aprX*.

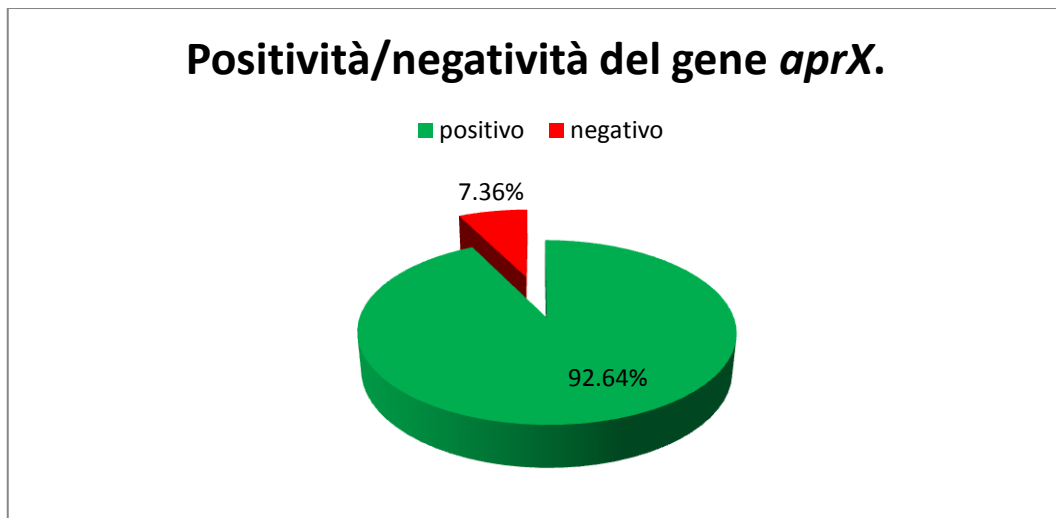


Figura 12 La figura riporta la percentuale dei ceppi di *Pseudomonas* che presentano presenza/assenza del gene *aprX*.

4. DISCUSSIONE

I batteri del genere *Pseudomonas*, in primis quelli facenti parte dello *Pseudomonas fluorescens group*, ricoprono un ruolo di primaria importanza per quanto riguarda l'alterazione degli alimenti.

Con la finalità di valutare il potenziale alterante di alcuni ceppi di campo appartenenti a questo specifico gruppo tassonomico, è stata dapprima effettuata una caratterizzazione fenotipica di sette nuovi ceppi arrivati in laboratorio. Mediante l'utilizzo del terreno *Potato Dextrose Agar* (PDA) è stato possibile identificare i ceppi produttori del pigmento blu. Il PDA è riportato in letteratura come il terreno di elezione, accanto al terreno minimo MBM (*Minimal Bacterial Medium*), per la valutazione della produzione del blu (Andreani et al., 2014; Martin et al., 2011). I risultati di questo studio hanno confermato il terreno PDA come un buon *medium* per analisi fenotipiche su ceppi di *Pseudomonas* per la produzione del pigmento, dal momento in cui tutti i ceppi presentavano una chiara e netta colorazione come si può notare nella Figura 5.

Alla caratterizzazione fenotipica è stata affiancata quella genotipica che ha permesso la tipizzazione di alcuni ceppi presi in esame, garantendo la distinzione dei singoli isolati mediante applicazione dell'approccio *MultiLocus Sequence Typing* proposto in letteratura da Andreani e colleghi (2014). Per tutti i ceppi è stato utilizzando il medesimo ciclo termico e le medesime condizioni di reazione. L'amplificazione e la successiva corsa elettroforetica non hanno presentato difficoltà, infatti nel gel sono state visualizzate bande ben definite, univoche, all'altezza aspettata e non sono mai state rilevate doppie bande. Dall'analisi delle varianti alleliche si è notato come ci siano dei ceppi che presentano i medesimi alleli di altri precedentemente campionati, a testimonianza del fatto che c'è una forte vicinanza genetica tra i ceppi produttori di blu. Si può inoltre notare come uno dei nuovi ceppi (PCA3) presenta il medesimo *SequenceType* di uno precedentemente analizzato (pf_13). Interessante ricordare che, nonostante i due ceppi abbiamo lo stesso profilo allelico, questi sono stati isolati da matrici alimentari differenti (uno da burro e l'altro da mozzarella). Il riscontro che due ceppi presentino lo stesso ST è una indicazione della loro vicinanza genetica, per

definire l'identità tra i due ceppi sarebbero necessarie ulteriori analisi biomolecolari.

Per studiare a fondo la correlazione tra i nuovi ceppi, quelli di riferimento e quelli isolati da precedenti campionamenti, le sequenze nucleotidiche ottenute in seguito a sequenziamento, sono state concatenate ed utilizzate per creare un albero filogenetico. Dall'albero si può notare come tutti i nuovi campioni tranne uno (811/1, che non ha manifestato alcuna pigmentazione su PDA) cadano nel "blue branch", cioè la regione dell'albero in cui sono raggruppati tutti i ceppi produttori del pigmento blu, come si può notare nella Figura 13.

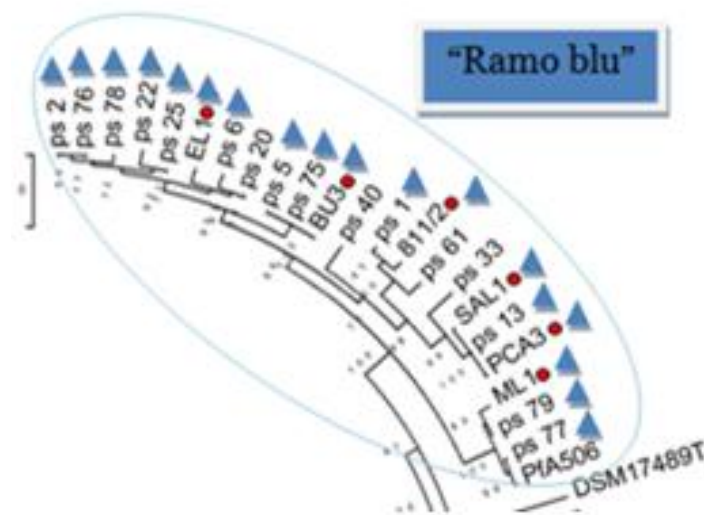


Figura 13 La figura riporta il "blue branch" dell'albero filogenetico

Questa è un'ulteriore conferma che il terreno PDA è un ottimo substrato per permettere la produzione del pigmento e che le analisi biomolecolari con MLST sono un ottimo mezzo per la *clusterizzazione* dei ceppi produttori di blu.

È stata infine valutata l'attività proteolitica di ceppi *TypeStrains* mediante due metodiche biochimiche: il test *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid* (TNBS) e il test dell'azocaseina. Per il test TNBS sono state effettuate tre differenti misurazioni spettrofotometriche che ci hanno permesso di confrontare l'attività proteolitica a 22 °C, 5 °C e 37 °C. Ad ogni misurazione è stata affiancata la costruzione di una retta di taratura ottenuta a partire da standard di glicina, in maniera da risalire alla concentrazione in mM di aminoacidi liberi nella soluzione. Dalle misurazioni effettuate alle tre differenti temperature si può notare come vi sia una lieve attività

proteolitica a 22 °C da parte di due ceppi (DSM4 e CECT1), una nulla attività a 5 °C mentre a 37 °C vi è attività proteolitica. La rilevazione a 37 °C, che viene fatta dopo il trattamento termico (che uccide tutti i batteri, quindi l'attività dipende dalle proteasi prodotte prima del trattamento e rilasciate nel mezzo), è stata evidenziata in quattro ceppi su diciotto (DSM6, DSM9, DSM10 e CECT3). La misurazione a 22 °C è stata effettuata dopo 24 ore di incubazione, quindi questa blanda attività proteolitica da parte dei ceppi può essere riconducibile o alla mancata produzione di enzimi proteolitici da parte dei ceppi o al fatto che le proteasi non abbiano avuto tempo di agire e quindi permettere la rilevazione di aminoacidi nella soluzione. Come detto precedentemente alla temperatura di 5 °C non vi è attività proteolitica. Molto probabilmente la temperatura va a rallentare l'attività metabolica del microrganismo che, in condizioni di stress termico investe le proprie energie nel metabolismo basale.

Per avere un riscontro biomolecolare, al test TNBS (per ogni misurazione a 22 e 5 °C) è stata affiancata, per sette campioni, un'analisi basata su estrazione dell'RNA, retrotrascrizione e seguente amplificazione genica con PCR-*endpoint* per valutare l'espressione genica del gene *aprX*. Confrontando i risultati ottenuti dal test TNBS e dall'espressione genica si nota che due ceppi presentano negatività in entrambi i casi, nel caso del ceppo DSM6 si ha negatività al test TNBS e positività nel profilo di espressione. Ciò indica come, nonostante ci sia espressione genica anche a 5 °C per questo ceppo, le proteasi non sono in grado di agire a temperature così basse e quindi non si è in grado di ottenere risultati rilevabili. Nel caso di quattro ceppi invece, vi è solo espressione genica a 22 °C ma manca attività proteolitica. Ciò indica che, nonostante vi sia espressione del gene *aprX*, nei due giorni di incubazione alla temperatura prestabilita, la proteasi non ha avuto tempo di agire.

L'ulteriore test biochimico effettuato per lo studio dell'attività proteolitica è il test dell'azocaseina effettuato su sette ceppi *Type Strains*. Il test è risultato positivo per tutti i campioni analizzati ad eccezione di CECT2 che infatti non presentava né positività al test TNBS né espressione genica alle due temperature precedentemente citate. Osservando i dati dell'espressione genica del test TNBS e del test dell'azocaseina si può osservare una particolarità che è in disaccordo con

uno studio improntato proprio sull'attività proteolitica di *Pseudomonas* (Marchand et al., 2009). Nello studio di Marchand e colleghi si afferma che *P. lundensis* e *P. fragi* sono i ceppi aventi la maggior attività proteolitica in latte e che questa è dovuta all'attività della proteasi AprX. Dai nostri dati invece, si nota come *P. lundensis* (DSM9) non esprima il gene *aprX*, ma presenti positività sia al test TNBS (dopo due settimane a 37 °C) sia al test dell'azocaseina. Ciò starebbe ad indicare come la presenza di aminoacidi liberi nella soluzione possa essere riconducibile alla presenza di proteasi diverse dall'Aprx.

È stata infine effettuata un'analisi di *screening* per la presenza/assenza del gene *aprX* in 68 ceppi di campo di *Pseudomonas*. Si è visto che il 93% dei ceppi presenta il gene codificante per la proteasi, ciò va a confermare quanto precedentemente riportato in letteratura: che nonostante il gene *aprX* sia molto diffuso tra i ceppi di *P.fluorescens*, sono pochi quelli che hanno effettivamente l'attività proteolitica che può procurare alterazioni negli alimenti e che questo dipende dall'espressione del gene.

Dai risultati ottenuti dai nostri studi dunque sarebbero CECT398 (*P.fluorescens*), DSM14020T (*P.rhodesiae*), e soprattutto DSM17489T (*P.orientalis*) i ceppi maggiormente proteolitici per la matrice lattiero casearia e non *P.fragi* come precedentemente riportato in letteratura (anche se ovviamente non si può escludere una ceppo specificità di fenotipo). Un discorso a parte merita *P. lundensis* che si conferma proteolitica ma probabilmente per l'attività di una proteasi diversa da AprX ma comunque termostabile.

5. BIBLIOGRAFIA

- 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 (2014) 116 -126
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H. and Oyazu, H. (2000). “Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1563-1589.
- Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D.L., Devriese, L.A., De Zutter, L., and Van Hoof, J. (1999) “A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat”. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 15–28.
- Arslan, S., Eyi, A. and Ozdemir, F. (2011). “Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses”. *Journal of Dairy Science*, 94: 5851-5856.
- Bilhère, E., Lucas, P.M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2000) “Multilocus Sequence Typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination”. *Applied and environmental microbiology*, 1291-1300.
- Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K.(2004) “Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities”. *PNAS*, Vol 101, 16630-16635
- Chen, J., Chen, Q., Jiang, L., Cheng, C., Bai, F., Wang, J., Mo, F. and Fang, W. (2010) “Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes*”. *BMC Microbiology*, 10:97.
- Cleto S., Matos S., Kluskens L, Vieira M. J. (2012) “Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant”. *Plos One*
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P. and Heyndrick, M. (2011). “Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk”. *Applied and environmental microbiology*, 77: 460–470.
- Decimo M., Morandi S., Silveti T., Brasca M. (2014) “Characterization of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria isolated from Italian Bulk Tank Milk” *Journal of Food Science* _ Vol. 00, Nr. 0, 2014

- Delétoile, A., Passet, V., Aires, J., Chambaud, I., Butel M.J., Smokvina, T. and Brisse, S. (2010) "Species delineation and clonal diversity in four *Bifidobacterium* species as revealed by multilocus sequencing". *Research in Microbiology*, 1-9.
- Do, T., Gilbert, S.C., Clark, D., Ali, F., Fatturi Parolo, C.C., Maltz, M., Russel, R.R., Holbrook, P., Wade, W.G. and Beighton, D. (2010) "Generation of diversity in *Streptococcus mutans* genes demonstrated by MLST". *Genetics*, 175, 1251-1266.
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., Gaillard, J.L. and Dary, A. (2008). "Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them". *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 188-196.
- Franzetti, L. and Scarpellini, M. (2007). "Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods". *Annals of Microbiology*, 57 (1): 39-47.
- Gennari, M., and Dragotto, F. (1992). "A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water". *Journal of Applied Bacteriology*, 72 (4): 281–8.
- Giaccone V., (2010) " *Pseudomonas* e prodotti lattiero-caseari" *Medicina Veterinaria Preventiva – supplemento al n. 32*
- Guanhao, B., Yongkang, L., Ying, Z. and Fushang, C. (2010). "Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2015–2020
- Hilario, H., Buckley, R.T. and Young, J.M. (2004). "Improved resolution on the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA". *Antoine van Leewenhoek*, 86, 51-64.
- Johnsen, K., Andersen, S. and Jacobsen, C.S. (1996). "Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars". *Applied and environmental microbiology*, Oct. 1996, 3818-3825.
- Loper, J.E. (1988). "Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain". *Disease control and Pest Management, Phytopathology*, 166-172.
- Marchand S., Coudijzer K., Heyndrickx M., Dewettinck K., De Block J. (2008). "Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk". *International Dairy Journal*, 18: 514-519

Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., De Vos, P., Devreese, B., Heyndrickx, M. and De Block, J. (2009). "Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas species*". *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2): 68-77.

Martin, N. H., Murphy, S.C., Ralyea, R.D., Wiedmann, M. and Boor, K.J. (2011) "When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage". *J. Dairy Sci.*, 94 :3176–3183.

Meiden M., Bygraves J., Feil E., Morelli G., Russell J., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D., Feavers I., Achtman M., Spratt B. (1998) "Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms" *PNAS* Vol. 95, pp. 3140–3145,

Meiden, M.J.C (2006) "Multilocus Sequence Typing of Bacteria". *Annu. Rev. Microbiol.*, 60:561–88.

Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N.J. (2002). "Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent e nonfluorescent *Pseudomonads*". *Applied and Environmental Microbiology*, 2745-2753.

Mulet, M., Bennassar, A., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E. (2009). "An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas species* and for their detection in environmental samples". *Molecular and Cellular Probes*, 23: 140-147

Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E. (2010) "DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas species*". *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.

Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E. (2010). "DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas species*". *Environmental Microbiology*, 12(6): 1513-1530.

Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. (2005) "Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria". *Microbiological research*, 161, 334-346.

Nogarol, C., Bianchi, D.M., Vencia, W., Losio, M.N., Zuccon, F. and Decastelli, L. (2010) "Caratterizzazione molecolare di isolati di *Pseudomonas fluorescens* da prodotti lattiero-caseari: ottimizzazione di un protocollo PFGE". XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Volume Atti, 119:120.

Nogarol C., Acutis P. L., Bianchi D. M., Maurella C., Peletto S., Gallina S., Adriano D., Zuccon F., Borrello S., Caramelli M., Decastelli L. (2013) "Molecular Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolates Involved in the Italian "Blue Mozzarella" Event". *Journal of Food Protection*, Vol. 76, No. 3, 2013, Pages 500–504

- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M. (1973). "Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23: 333-339
- Palleroni, N.J. (2010). "The *Pseudomonas* story". *Environmental Microbiology*, 12(6): 1477-1383.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M., Velázquez, E.(2009) "Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*".*Science Direct*, 9(6), 1132–1147.
- Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin, J.S. (2003). "Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers". *Analytical Chemistry*, 75: 3817-3822.
- Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S., Levy S., Jackson R. (2011) "Pseudomonas genomes:diverse and adaptable". *FEMS Microbiol Rev* 35 (2011) 652–680
- Subaaharan, S., Blackall, L.L. and Blackall, P.J. (2010) "Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*".*Veterinary Microbiology*, 141, 354-361.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R., Waites, W.M. (2002). "Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage". *Journal of Applied Microbiology*, 93: 205-213.
- Temple, T.N., Stockwell, V.O., Loper, J.E. and Johnson, K.B. (2004) "Bioavailability of iron to *Pseudomonas fluorescens* strain A506 on flowers of pear and apple". *Phytopathology*, 94:1286-1294.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S. (2000). "Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes". *Microbiology*, 146: 2385-2394.