UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

Studio dell'evoluzione di *Pseudomonas fluorescens* in Long-Term Stationary Phase: caratterizzazione genetica e fenotipica

Relatore:
Prof.ssa Barbara Cardazzo

Laureanda:
Federica Broccoli

Matricola n. 2105373

Anno Accademico 2023/2024

Il frutto di un percorso,

l'inizio di un altro.

INDICE

ABSTRACT 1
1. INTRODUZIONE 3
1.1. GENERE *PSEUDOMONAS*: STORIA E CLASSIFICAZIONE 3
1.2. CARATTERISTICHE DEL GENERE *PSEUDOMONAS* 4
1.3. *PSEUDOMONAS* E LA SUA IMPORTANZA NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE 6
1.3.1. *SPOILAGE* DOVUTO AD ENZIMI 6
1.3.2. ALTERAZIONI DA PIGMENTI 8
1.4. PRODUZIONE DI BIOFILM 9
1.5. DINAMICHE DI CRESCITA E FASI DI SVILUPPO DELLA POPOLAZIONE BATTERICA 12
1.5.1. FENOMENI ASSOCIATI ALLA LTSP 13
1.6. MECCANISMI MOLECOLARI DI PERSISTENZA 18
1.6.1. SISTEMA TOSSINA-ANTITOSSINA (TA) 18
1.6.2. RISPOSTA STRINGENTE DA MANCANZA DI NUTRIENTI E (p)ppGpp 20
1.6.3. INTERAZIONE TRA (p)ppGpp ED ALTRI MECCANISMI MOLECOLARI 21
2. SCOPO DELLO STUDIO/OBIETTIVI 23
3. MATERIALI E METODI 24
3.1. CEPPI BATTERICI 24
3.2. PREPARAZIONE DELLE *Long-Term Cultures* 25
3.3. SCHEMA DELL'ESPERIMENTO 26
3.4. ANALISI SULLE COLTURE DI 2 ANNI A 4°C E 22°C 28
3.4.1. CONTE BATTERICHE SU PIASTRE E GENERAZIONE CURVE DI CRESCITA 28
3.4.2. IDENTIFICAZIONE DEI *PERSISTERS* 29
3.4.3. IDENTIFICAZIONE DEI VBNC 31
3.4.3.1. USO DEL COLORANTE PMAxx 32
3.4.3.2. ESTRAZIONE DNA PER BOLLITURA 33
3.4.3.3. REAL-TIME PCR 33
3.4.3.4. QUANTIFICAZIONE DEI CAMPIONI MEDIANTE CURVE STANDARD 35
3.4.4. MOTILITÀ 36
3.4.5. SEQUENZIAMENTO COLONIE PER VALUTARE LE MUTAZIONI 38
3.4.5.1. ESTRAZIONE DNA DA COLONIE 39
3.4.5.2. QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO 40
3.4.5.3. PREPARAZIONE LIBRERIE 40
3.4.5.4. ANALISI QUANTITATIVA DELLE LIBRERIE 44
3.4.5.5. ANALISI QUALITATIVA DELLE LIBRERIE 44
3.4.5.6. POOLING DELLE LIBRERIE E SEQUENZIAMENTO 46

3.4.6. ANALISI BIOINFORMATICA DEI DATI NGS 46
3.4.7. VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI 49
3.5. COMPOSIZIONE TERRENI COLTURALI E SOLUZIONI 50
4. RISULTATI E DISCUSSIONE 52
4.1. MONITORAGGIO DELLE *Long-Term Cultures* 52
4.2. QUANTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI POPOLAZIONI BATTERICHE: CONTE SU PIASTRA, IDENTIFICAZIONE DEI *PERSISTERS* E DELLE CELLULE VBNC 52
4.3. MOTILITA' 63
4.3.1. *SWIMMING* 4°C e 22°C 63
4.3.2. *SWARMING* 4°C e 22°C 66
4.4. SEQUENZIAMENTO DELLE COLONIE 75
4.4.1. VALUTAZIONE QUALITA' DEL SEQUENZIAMENTO 75
4.4.2. ANALISI DELLE MUTAZIONI (BRESEQ) 77
5. DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI 85
ALLEGATO 1 87
ALLEGATO 2 87
ALLEGATO 3 88
ALLEGATO 4 88
ALLEGATO 5 89
ALLEGATO 6 89
ALLEGATO 7 90
ALLEGATO 8 91
ALLEGATO 9 91
ALLEGATO 10 91
ALLEGATO 11 92
ALLEGATO 12 96
ALLEGATO 13 99
ALLEGATO 14 101
BIBLIOGRAFIA 103
RINGRAZIAMENTI 111

ABSTRACT

Pseudomonas fluorescens è un batterio Gram-negativo ubiquitario, noto per la sua plasticità metabolica e genomica. Nel settore alimentare, la sua natura psicrotrofa lo rende uno dei principali agenti di spoilage per i prodotti refrigerati, causando difetti organolettici tramite la produzione di enzimi termostabili e pigmenti, come nel noto caso della "mozzarella blu". La sua capacità di persistere in ambienti ostili, spesso tramite la formazione di biofilm, pone sfide significative per la sicurezza e la qualità degli alimenti. La fase stazionaria di lunga durata (Long-Term Stationary Phase, LTSP) rappresenta un eccellente modello di laboratorio per studiare le dinamiche evolutive e i meccanismi di sopravvivenza batterica in condizioni di stress e carenza di nutrienti.

Questo lavoro di tesi si è posto l'obiettivo di investigare le strategie adattative, a livello fenotipico e genetico, di *P. fluorescens* durante un periodo di incubazione prolungato, mimando le condizioni della LTSP. A tal fine, popolazioni clonali sono state incubate per due anni a due diverse temperature di conservazione, 4°C e 22°C, per simulare condizioni di refrigerazione e ambientali. A intervalli regolari, sono stati isolati cloni dalle colture in evoluzione per una caratterizzazione fenotipica completa, che ha incluso conte vitali, analisi delle curve di crescita, valutazione della motilità (swimming e swarming) e quantificazione delle sub-popolazioni di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) e persisters. Le basi genetiche dell'evoluzione sono state indagate tramite sequenziamento dell'intero genoma (WGS) di cloni selezionati, seguito da analisi bioinformatica per l'identificazione delle mutazioni accumulate.

I risultati hanno evidenziato una divergenza evolutiva tra le popolazioni incubate alle due temperature. Sono emerse significative variazioni fenotipiche, in particolare nei profili di motilità e nella prevalenza di stati dormienti come VBNC, suggerendo l'adozione di strategie di sopravvivenza temperatura-dipendenti. L'analisi genomica ha rivelato l'accumulo di specifiche mutazioni in geni chiave coinvolti in processi regolatori globali, nel metabolismo e nella risposta allo stress, correlando direttamente i cambiamenti genetici agli adattamenti fenotipici osservati.

Complessivamente, questo studio dimostra come la LTSP agisca da potente motore selettivo, promuovendo in *P. fluorescens* percorsi evolutivi distinti e fornendo preziose informazioni sui meccanismi che ne determinano la persistenza e il potenziale alterativo negli ecosistemi alimentari.

1. INTRODUZIONE

1.1. GENERE *PSEUDOMONAS*: STORIA E CLASSIFICAZIONE

Il genere *Pseudomonas* rappresenta attualmente il gruppo con il maggior numero di specie note tra i batteri Gram-negativi. Le specie che appartengono a questo genere sono ampiamente distribuite negli ecosistemi naturali, svolgono ruoli ecologici e presentano numerose applicazioni in ambito biotecnologico (Gomila et al., 2015). La classificazione attuale del genere *Pseudomonas* è la seguente: Famiglia *Pseudomonadaceae*, Ordine *Pseudomonadales*, Classe *Gammaproteobacteria*, Phylum *Pseudomonadota*, Regno *Bacteria*, Dominio *Prokaryota* (Silby et al., 2011). Il genere *Pseudomonas* è uno dei più antichi riconosciuti nella tassonomia batterica, infatti ha subito numerose revisioni nel corso del tempo (Lalucat et al., 2021). Nel 1894 Walter Migula propose per la prima volta il nome *Pseudomonas* per raggruppare tutti i batteri Gram-negativi, aerobi, a forma di bastoncello e provvisti di flagelli polari. *Pseudomonas aeruginosa* fu denominata per la prima volta da Schroeter nel 1872 e, sebbene il suo ruolo nelle infezioni umane non fosse ancora stato riconosciuto, i medici avevano già da tempo osservato la comparsa occasionale di macchie blu o verde-bluastre sulle medicazioni chirurgiche. Solo nel 1882 Gessard isolò *P. aeruginosa* in coltura pura da una ferita e determinò che la colorazione era dovuta a un pigmento prodotto da questo microrganismo (Gessard, 1882). Queste scoperte iniziali posero le basi per lo studio della pigmentazione come tratto distintivo del genere Pseudomonas. In passato, alcune specie erano facilmente identificate da un insieme di tratti fenotipici caratteristici. Ad esempio, un bacillo Gram-negativo, mobile grazie a flagelli polari, che produceva un pigmento verde fluorescente, era considerato una specie di *Pseudomonas*. Tuttavia, molte specie di *Pseudomonas* non producono pigmenti fluorescenti, il che ha portato, in passato, a errori di classificazione e a sovrapposizioni con altri generi fenotipicamente simili. La definizione di base fornita da Palleroni nel Bergey's Manual del 1984 enfatizzava la morfologia (bacilli dritti o leggermente curvi), la motilità (uno o più flagelli polari), e la fisiologia (aerobica, metabolismo strettamente respiratorio, chemioorganotrofi) (Williamson et al., 2010). Questa definizione, però, si rivelò troppo ampia, portando all'inclusione di organismi non strettamente correlati. Studi successivi di ibridazione rRNA-DNA condotti da Palleroni permisero di suddividere il genere in cinque gruppi principali, denominati *rRNA Groups* I–V. Nel corso degli ultimi trent'anni, i membri dei gruppi II–V sono stati progressivamente riclassificati in altri generi, tra cui *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Acidovorax* e *Brevundimonas*. Le specie rimaste all'interno del genere *Pseudomonas* appartengono al *rRNA Group* I, ulteriormente suddiviso in otto gruppi principali: *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. syringae* e il gruppo *incertae sedis*, termine latino che indica una posizione tassonomica incerta (Moore & Flaws, 2011). Con l'introduzione di metodi molecolari basati sul sequenziamento dell'RNA ribosomiale 16S, è stato possibile riclassificare molte specie precedentemente attribuite a *Pseudomonas*, riassegnandole a generi filogeneticamente più appropriati. Un'ulteriore evoluzione della classificazione è stata resa possibile grazie al sequenziamento di quattro geni housekeeping (*16S rRNA*, *gyrB*, *rpoB* e *rpoD*), che ha permesso a Mulet et al. (2010) di

identificare due principali *lineage*: *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*. Il primo comprende tre gruppi principali, rappresentati da *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* e *P. oleovorans*; il secondo è suddiviso in sei gruppi, che includono le specie *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* e *P. straminea* (Figura 1).

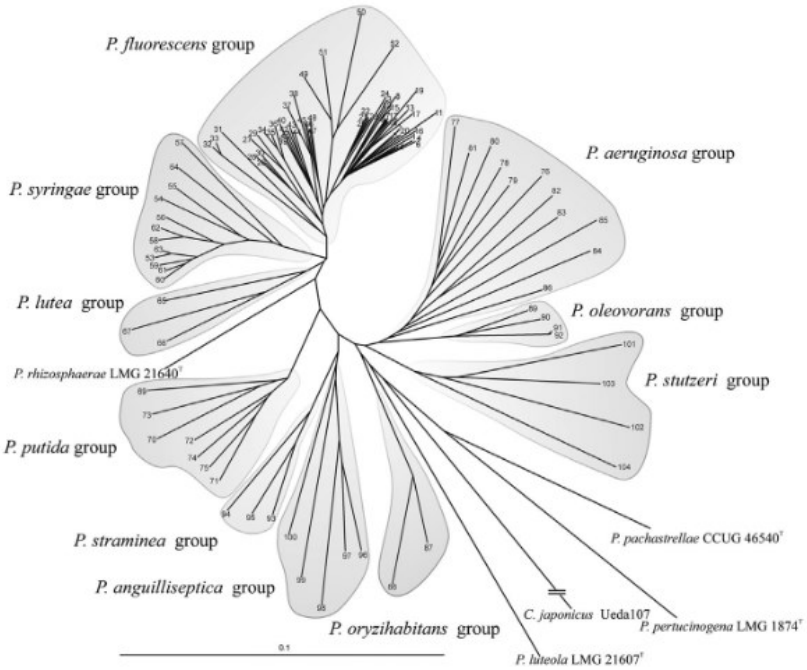

Figura 1: Albero filogenetico di 107 ceppi di Pseudomonas basato su analisi filogenetica di sequenze parziali dei geni 16S rRNA,gyrB, rpoB e rpoD (Mulet et al., 2010)

1.2. CARATTERISTICHE DEL GENERE *PSEUDOMONAS*

I membri del genere *Pseudomonas* sono microrganismi versatili e adattabili, in grado di colonizzare una vasta gamma di ambienti, riflettendo una notevole capacità metabolica e un'elevata adattabilità a condizioni ambientali variabili (Figura 2) (Silby et al., 2011). Si tratta di batteri Gram-negativi, aerobi obbligati, non fermentanti, catalasi e ossidasi positivi, mesofili e psicrotolleranti, asporigeni, in quanto incapaci di formare spore (Caldera et al., 2015). La loro versatilità metabolica e fisiologica consente la colonizzazione di molteplici habitat, sia terrestri che acquatici, tra cui suolo, acqua, tessuti animali, piante e alimenti. I membri del genere *Pseudomonas* sono capaci di sopravvivere a condizioni ambientali estreme, inclusi ampi intervalli di pH. Ad esempio, gli habitat naturali, sia acquatici che terrestri, di *Pseudomonas aeruginosa* includono ambienti con pH compreso tra 4,5 e 9,5. In risposta a condizioni acide, *P. aeruginosa* sintetizza quantità significative di un fosfolipide addizionale, denominato 2'-alanil-fosfatidilglicerolo (A-PG). In tali condizioni, l'espressione del gene PA0920, codificante per l'enzima A-PG sintasi (A-PGS), aumenta significativamente (fino a 4,4 volte) (Klein et al., 2008). La maggior parte degli isolati di *Pseudomonas* mostra un'elevata tolleranza termica, con

capacità di crescita in un ampio intervallo di temperatura, compreso tra 4 °C e 45 °C (Caldera et al., 2015).

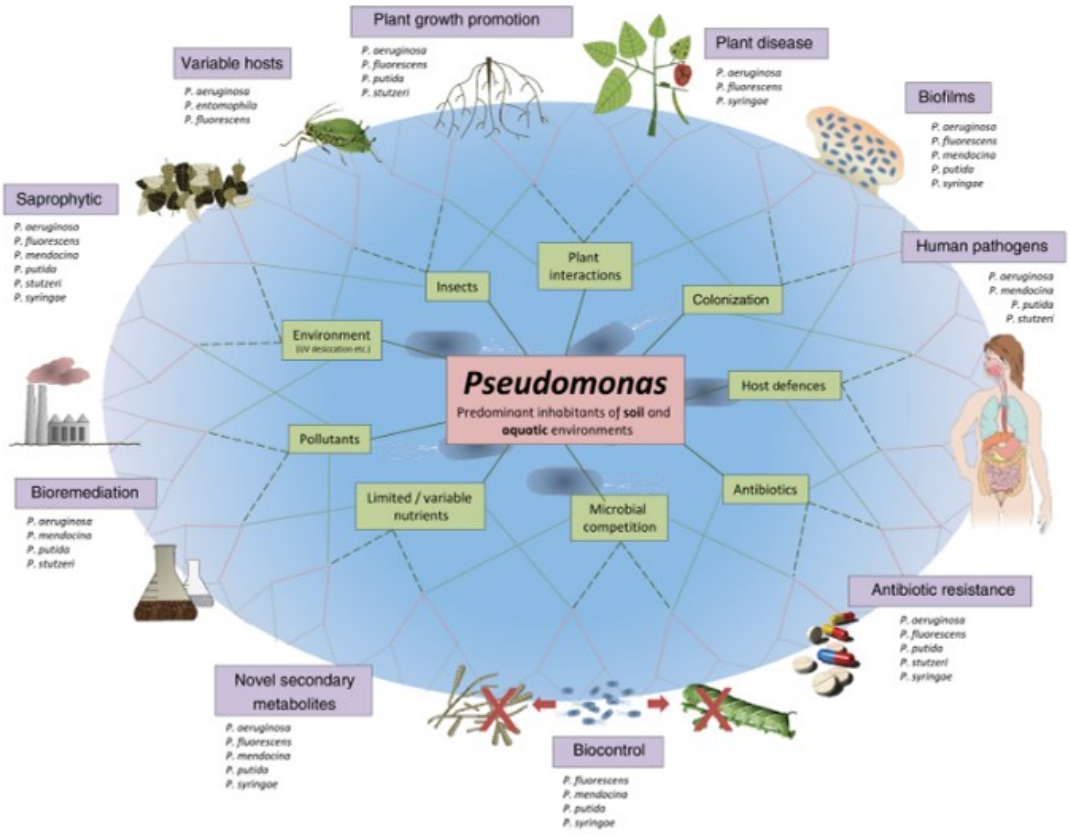

Figura 2: La gamma funzionale e ambientale di Pseudomonas spp. (Silby et al., 2011)

La capacità di crescere a basse temperature (psicrotolleranza) e di produrre enzimi e/o pigmenti che possono influenzare i prodotti alimentari rende *Pseudomonas* uno dei principali agenti alteranti degli alimenti refrigerati. *P. aeruginosa* è considerata un patogeno particolarmente difficile da eradicare a causa della sua intrinseca resistenza antimicrobica e della capacità di formare biofilm, che aumentano la tolleranza ai trattamenti antimicrobici e riducono l'efficacia delle difese immunitarie dell'ospite. Le analisi genomiche hanno rivelato diversi fattori alla base della diversità e dell'adattabilità delle *Pseudomonas spp.*, tra cui il trasferimento genico orizzontale e i riarrangiamenti genomici. Il genere *Pseudomonas* possiede un pangenoma, ovvero l'intero insieme dei geni e delle loro varianti che possono essere identificati in una data specie, estremamente vasto e composto da 326.707 cluster proteici. La curva del pangenoma non raggiunge un plateau, suggerendo che una frazione significativa della diversità genica di *Pseudomonas* rimane ancora da scoprire. Questa vasta riserva genetica è fondamentale per la loro capacità di adattamento (Saati-Santamaría et al., 2022). Tale plasticità genomica non solo consente la colonizzazione di nicchie ecologiche diverse, ma spiega anche l'emergere di ceppi dotati di specifici profili enzimatici e metabolici responsabili di alterazioni alimentari, come quelle che verranno discusse di seguito.

1.3. *PSEUDOMONAS* E LA SUA IMPORTANZA NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

Le specie di *Pseudomonas* mostrano una vasta diversità e adattabilità, il che spiega la loro ampia distribuzione in numerosi habitat ecologici, inclusi il suolo, l'acqua, gli ambienti marini, i prodotti medicali, e, in particolare, i prodotti alimentari (Molina et al., 2013). La loro notevole diffusione è direttamente correlata alla loro elevata complessità e plasticità genomica. Nel contesto alimentare, le *Pseudomonas spp.* sono contaminanti responsabili della riduzione della *shelf-life* dei prodotti che necessitano della catena del freddo in quanto sono psicrotrofi e sono in grado di sopravvivere e moltiplicarsi in ambienti refrigerati (Quintieri et al., 2020). La loro attività metabolica ottimale è espressa a temperature comprese tra 20 e 30 °C, ma, nonostante ciò, possono crescere e moltiplicarsi a basse temperature grazie all'arricchimento di acidi grassi polinsaturi nei lipidi della membrana, i quali assicurano una permeabilità sufficiente per la fluidità della membrana stessa e l'attività di trasporto dei metaboliti necessari per la crescita e la riproduzione dei batteri a basse temperature (Drews et al., 1998). La maggior parte delle specie di *Pseudomonas* non è patogena e i microrganismi appartenenti a questo genere sono frequentemente associati alla scarsa qualità dei prodotti alimentari (Molina et al., 2013). Le specie di *Pseudomonas* sono i microrganismi psicrotrofi responsabili del deterioramento più diffusi, in particolare negli alimenti conservati in presenza di ossigeno con un elevato contenuto di acqua e pH neutro, come la carne rossa, il pesce, il pollame e il latte e i prodotti lattiero-caseari (Raposo et al., 2016).

1.3.1. *SPOILAGE* DOVUTO AD ENZIMI

Il deterioramento o *spoilage* di un prodotto alimentare è caratterizzato da qualsiasi cambiamento in quest'ultimo che lo rende inaccettabile dal punto di vista sensoriale per il consumatore. Si può trattare di danni fisici, cambiamenti chimici (ossidazione, cambiamento di colore) o comparsa di aromi e odori estranei dovuti alla crescita microbica e al metabolismo microbico nel prodotto. Il deterioramento microbico è di gran lunga la causa più comune del deterioramento e può manifestarsi sotto forma di crescita visibile, di cambiamenti della struttura (degradazione dei polimeri) o di odori e sapori sgradevoli (Gram et al., 2002). Il deterioramento, o *spoilage*, si può manifestare con l'alterazione del sapore, con la coagulazione indesiderata di proteine del latte in prodotti lattiero-caseari, con l'aumento di concentrazione di acidi grassi, aminoacidi liberi e composti organici indesiderati (Samaržija et al., 2012). Il deterioramento degli alimenti causato da *Pseudomonas spp*. può avvenire in diversi modi. Negli alimenti di origine animale, viene inizialmente metabolizzata la frazione di azoto non proteico. Successivamente, la produzione di lipasi o proteasi porta al rilascio di acidi grassi e amminoacidi, che possono causare odori sgradevoli, sapori alterati e rancidità, modificando il metabolismo (Dainty, 1996). I membri di *Pseudomonas* sono frequentemente coinvolti nella degradazione e nel deterioramento di una vasta gamma di alimenti grazie ai loro complessi sistemi enzimatici. Questi enzimi sono spesso

termostabili e rimangono attivi anche dopo trattamenti termici (come la pastorizzazione UHT) che invece vanno a causare la morte del batterio stesso (De Jonghe et al., 2010). La maggior parte dei batteri psicrotrofi ha la capacità di metabolizzare componenti che costituiscono gli alimenti quali grassi, proteine e carboidrati, rendendoli agenti di deterioramento estremamente adattabili (Shpigel et al., 2015). Facendo riferimento al settore lattiero-caseario, *P. fluorescens* è un contaminante comune nel latte crudo e pastorizzato, infatti le specie di *Pseudomonas* sono considerate predominanti, con una presenza che varia da meno del 10% a oltre il 75% del conteggio batterico totale del latte (Dogan & Boor, 2003). Durante la conservazione del latte crudo, esso produce numerosi enzimi lipolitici e proteolitici termoresistenti che riducono sia la qualità che la durata di conservazione del latte lavorato, portando a cambiamenti indesiderati quali rancidità, gelificazione, sapore amaro e discromie, come il noto fenomeno del formaggio mozzarella blu, causato dalla produzione di un pigmento blu (Dogan & Boor, 2003; Andreani et al., 2016). Enzimi come le lipasi, o triacilglicerolo idrolasi, catalizzano l'idrolisi dei trigliceridi in glicerolo e acidi grassi liberi, i quali provocano alterazioni del sapore (Arslan et al., 2011). In particolar modo i grassi insaturi a catena corta libera conferiscono sapori sgradevoli, definiti rancidi, quelli a catena media sono associati a sapori amari e schiumosi, mentre quelli a catena lunga non influenzano il sapore del latte e dei suoi derivati (Champagne et al., 1994). Nel formaggio, le lipasi vengono incorporate dai globuli di grasso e vi restano durante il processo di stagionatura, contribuendo ai fenomeni di degradazione nei formaggi duri e semiduri (Samaržija et al., 2012). Vi sono poi anche le lecitinasi, le quali sono in grado di danneggiare le membrane dei globuli di grasso presenti nel latte, rendendoli più suscettibili all'azione delle lipasi (Ray, 2004). L'enzima più comune di questa categoria di enzimi è la fosfolipasi C, prodotta dalla maggior parte dei ceppi di *Pseudomonas* (Fox et al., 1976). In termini generali, le proteinasi che vengono prodotte da batteri psicrotrofi destabilizzano le caseine mediante idrolisi formando una struttura gelatinosa che, nel caso del latte, si manifesta come una coagulazione del latte stesso durante la conservazione. Questo processo provoca una forte riduzione della resa produttiva in quanto il plasminogeno e la plasmina vengono liberati dalle micelle di caseina, influenzando la consistenza e le caratteristiche del prodotto finale (Samaržija et al., 2012). Le proteinasi di *Pseudomonas spp.* hanno la capacità di degradare la κ-caseina, la αs1-caseina e la β-caseina del latte, causando la distruzione fisica del sistema colloidale, che si manifesta principalmente sotto forma di coagulazione e sviluppo di un sapore intensamente amaro nel prodotto. Inoltre, la modificazione della caseina è favorita dall'attività delle proteinasi endogene del latte, come ad esempio la plasmina (Kumar et al., 2019). Le proteinasi prodotte da *Pseudomonas spp*. sono principalmente enzimi con massa molecolare compresa tra 40 e 50 kDa, che contengono almeno un atomo di zinco e che hanno un pH ottimale neutro o leggermente alcalino (Samaržija et al., 2012). Secondo uno studio condotto da Caldera et al. (2015) è stata riscontrata una perfetta corrispondenza tra l'attività proteolitica sulle proteine del latte e la presenza del gene aprX,

confermando il ruolo della metallo-proteasi alcalina extracellulare (AprX) nella degradazione del latte. Nonostante la termostabilità che dimostrano, la maggior parte di queste proteinasi risulta instabile a temperature di 55-60 °C a causa della formazione di un complesso enzima-caseina nel latte (Chen et al., 2003).

1.3.2. ALTERAZIONI DA PIGMENTI

Uno degli effetti alteranti più evidenti sugli alimenti è la capacità di alcuni ceppi di *Pseudomonas* di produrre pigmenti colorati o fluorescenti, che causano discromie nei prodotti alimentari. Questa problematica è venuta alla luce con particolare importanza in Italia nel 2010, quando si sono verificati i casi di "mozzarella blu" (Figura 3). Il forte impatto mediatico di questi episodi ha creato confusione tra consumatori ed esperti. Da un lato, l'isolamento di batteri del genere *Pseudomonas*, già ampiamente noti per provocare tali alterazioni, ha messo in evidenza l'assenza di pericoli per la salute del consumatore. Dall'altro lato, i sequestri ripetuti di prodotti con colorazione blu e l'imprevedibilità del fenomeno sono diventati un problema serio per i produttori del settore lattiero-caseario (Chiesa et al., 2014). La sostanza responsabile della colorazione blu nella mozzarella contaminata era il composto indigoidina, prodotto da *P. fluorescens* (Caputo et al. 2015). Successivamente, alcuni studi hanno confermato che la sfumatura blu creata da ceppi di *P. fluorescens* non era dovuta all'indigoidina, bensì ad un derivato dell'indolo (Andreani et al. 2015).

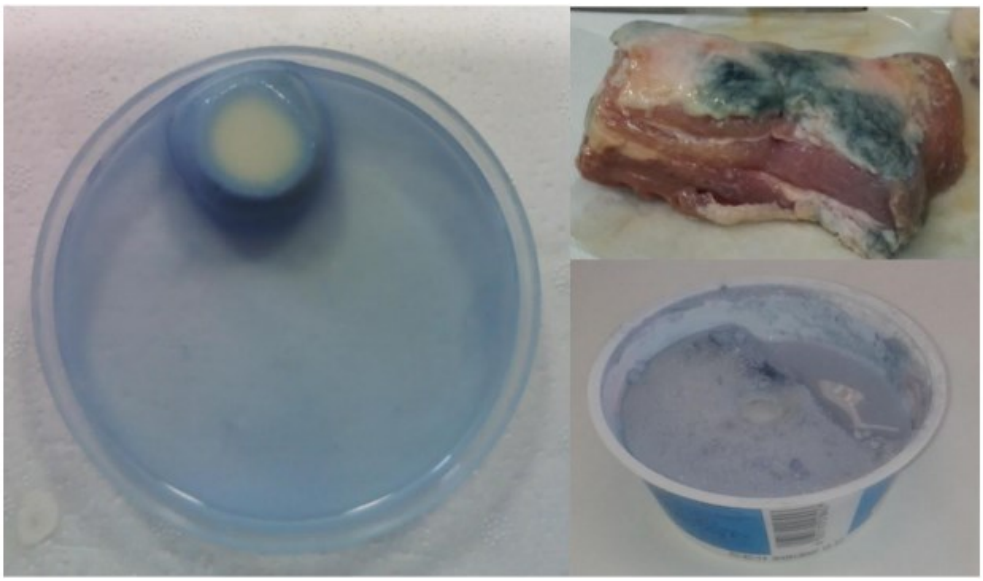

Figura 3: Colorazione blu causata da ceppi di P. fluorescens. Mozzarella, carne di maiale e ricotta deteriorati a causa della produzione del pigmento blu

Inoltre, uno studio recente ha riportato che i geni coinvolti nella produzione del pigmento blu potrebbero svolgere un ruolo nella via biosintetica del triptofano e fornire anche protezione antiossidante (Andreani et al. 2019). Alcune specie di *Pseudomonas spp*. producono anche altri pigmenti come ad esempio: pioverdina, piocianina, piorubina, piomelanina, indigoidina (Tabella

1) (Raposo et al., 2016). La pioverdina è un sideroforo, ovvero una molecola specializzata nel catturare il ferro dall'ambiente. Poiché il ferro è un nutriente essenziale e spesso scarso, la pioverdina conferisce a questi batteri un grande vantaggio competitivo (Del Olmo et al., 2017).

Tabella 1: Pigmenti prodotti da Pseudomonas spp.

Pigmento	Colore	Specie produttrici	Caratteristiche
Piocianina	Blu-verdastro	*P. aeruginosa*	Fattore di virulenza, tossico
Pioverdina	Giallo-verdastro (fluorescente)	*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*	Sideroforo (cattura il ferro), usato per l'identificazione
Pigmento blu	Blu intenso	*P. fluorescens* (alcuni ceppi)	Causa la "mozzarella blu", è un derivato dell'indaco
Piorubina	Rosso-bruno	*P. aeruginosa* (alcuni ceppi)	Meno comune, contribuisce a colorazioni scure
Piomelanina	Marrone-nero	*P. aeruginosa* (alcuni ceppi)	Deriva dalla tirosina, ha un ruolo protettivo

1.4. PRODUZIONE DI BIOFILM

Come detto in precedenza, il genere *Pseudomonas* ha una grande versatilità metabolica e plasticità genomica che permette ai suoi membri di affrontare diverse forme di stress e adattarsi in molti ambienti terrestri e acquatici. In particolare, l'acqua potabile è considerato un habitat rilevante per *Pseudomonas spp*. (Vaz-Moreira et al., 2012), ad esempio *Pseudomonas aeruginosa* è un patogeno opportunista degli impianti idrici degli edifici (OPPP), responsabile di infezioni correlate all'assistenza sanitaria (HAIs) (Hayward et al., 2022). La sua presenza in questo tipo di habitat può derivare dalla capacità di questi batteri di colonizzare le falde acquifere. Un ulteriore fattore significativo associato alla presenza di *Pseudomonas* spp. nell'industria alimentare è la loro capacità di formare biofilm sulle superfici di tubature, nastri trasportatori e attrezzature di produzione. I biofilm batterici potenziano l'adattabilità cellulare, ostacolano l'eradicazione dei microrganismi stessi e aumentano la resistenza agli antimicrobici e, inoltre, contribuiscono anche alla persistenza di altri batteri patogeni all'interno di questi ambienti (Da Silva Alexandre et al., 2025). Il biofilm permette ai batteri di persistere nelle tubature e negli impianti di lavorazione degli alimenti, i quali fungono da substrati per la crescita dei batteri stessi. La formazione di biofilm da parte di *P. fluorescens* è dipendente dalla temperatura, è infatti stato visto che è favorita a temperature più basse (10 °C) (Rossi et al., 2016). Alcuni ceppi di *P. fluorescens* presentano diverse forme di motilità, come swimming, swarming e twitching, che favoriscono la loro diffusione e la colonizzazione delle superfici (Quintieri et al., 2020). Il biofilm può essere formato da una singola specie batterica, inclusi organismi che causano deterioramento e

organismi patogeni, tuttavia, è spesso costituito da una miscela di microrganismi presenti nell'ambiente. Pertanto, il biofilm è generalmente definito come una comunità complessa, strutturalmente eterogenea e geneticamente divergente di microrganismi che coesistono su una superficie solida sotto forma di una matrice extracellulare composta da composti polimerici (EPS). Rispetto alle cellule della stessa specie batterica, il biofilm è difficile da rimuovere con i metodi di pulizia convenzionali e le sostanze chimiche antibatteriche, per questo motivo esso rappresenta una fonte persistente di contaminazione dei prodotti alimentari (Samaržija et al., 2012). Uno studio di Wang et al. (2018) ha studiato la formazione del biofilm di *P. fluorescens* ed ha osservato che *P. fluorescens* è in grado di trasferirsi su una superficie di acciaio inossidabile in un tempo molto breve e che il biofilm ha mostrato una certa resistenza a tutti e quattro i disinfettanti testati, ovvero ipoclorito di sodio (SH), biossido di cloro (CD), acqua elettrolizzata leggermente acida (sAEW) e acqua elettrolizzata acida (AEW). L'AEW è risultata efficace a dosi inferiori rispetto a quelle del trattamento tradizionale con SH, potrebbe quindi essere un'alternativa promettente per l'eliminazione dele cellule del biofilm negli impianti di trasformazione alimentare. La notevole resistenza dei biofilm ai trattamenti è dovuta alla complessa struttura della loro matrice extracellulare. Per comprendere la sua composizione *Pseudomonas aeruginosa* è stata ampiamente studiata come organismo modello nella formazione di biofilm (Ghafoor et al., 2011). Tre esopolisaccaridi svolgono un ruolo fondamentale nell'adesione alle superfici, nella formazione e nella stabilità dell'architettura del biofilm: Psl, Pel ed alginato (Billings et al., 2013). Il polisaccaride Psl è un pentasaccaride normalmente costituito da unità di d-glucosio, d-mannosio ed l-ramnosio. Il Psl è necessario per l'adesione iniziale delle cellule sessili, cioè cellule strettamente vincolate e fermamente attaccate l'una all'altra e anche, di solito, a una superficie solida. Nel biofilm maturo il Psl è accumulato nella parte periferica della struttura contribuendo alla sua stabilità strutturale. Il Pel è un polimero polisaccaridico cationico composto da N-acetil-d-glucosammina e N-acetil-d-galattosammina parzialmente deacetilate, un componente essenziale della matrice del biofilm ed è coinvolto nell'adesione iniziale alle superfici, oltre che nel mantenimento dell'integrità dello stesso. La sintesi di Psl e Pel è ceppo-specifica e può essere modulata in risposta alle condizioni ambientali (Colvin et al., 2011). Infine, l'alginato è un polimero acetilato carico negativamente, costituito da residui di acido mannuronico e acido guluronico. I rapporti tra questi ultimi influenzano le proprietà viscoelastiche dei biofilm. Esso ha numerose e importanti funzioni, tra cui la maturazione del biofilm, la protezione dalla fagocitosi e dall'opsonizzazione, e la ridotta diffusione degli antibiotici attraverso il biofilm. Stress ambientali, come il trattamento antimicrobico, possono causare la lisi cellulare che induce il rilascio di DNA nell'ambiente. Questo DNA extracellulare (eDNA) è uno dei costituenti fondamentali del biofilm in quanto rappresenta fonte di nutrienti per i batteri formanti il biofilm, supporta l'organizzazione e l'allineamento cellulare mediante *twitching motility*, funge da chelante di cationi bivalenti (Mg^{2+} e Ca^{2+}) e attiva il sistema di secrezione di fattori di virulenza (Thi et al., 2020).

La formazione del biofilm è suddivisa in cinque stadi distinti (Figura 4):

I. Adesione iniziale: le cellule batteriche aderiscono alla superficie grazie ad interazioni elettrostatiche. Questa aderenza può essere inizialmente debole e reversibile;

II. Adesione irreversibile e colonizzazione: le cellule batteriche passano dall'adesione reversibile a quella irreversibile grazie al rafforzamento dell'adesione stessa mediante appendici superficiali delle cellule come flagelli e pili;

III. Formazione della matrice extracellulare: i batteri adesi crescono e si moltiplicano formando microcolonie ed iniziano a produrre una matrice extracellulare che dona loro protezione;

IV. Maturazione del biofilm: le microcolonie si sviluppano ulteriormente in strutture tridimensionali;

V. Distacco e dispersione: al centro della microcolonia, la cavità della matrice viene disgregata attraverso l'autolisi cellulare per la liberazione di cellule che possono staccarsi e disperdersi nell'ambiente, colonizzando altre superfici e dando inizio al ciclo di formazione del biofilm.

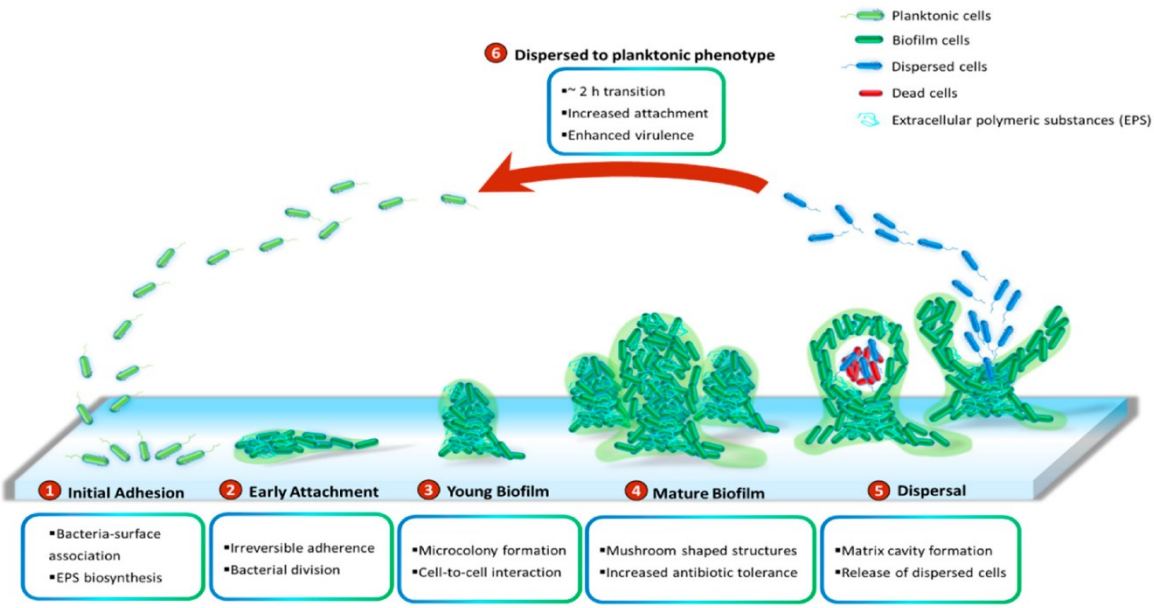

Figura 4: Fasi di formazione del biofilm (Thi et al., 2020)

Le cellule all'interno del biofilm sono generalmente eterogenee dal punto di vista fenotipico ma non per la composizione in geni: questo succede poiché all'interno della matrice ci sono gradienti differenti di nutrienti, ossigeno etc., che creano diversi microambienti ai quali le cellule rispondono alterando la loro espressione genica (Lopez et al., 2010).

1.5. DINAMICHE DI CRESCITA E FASI DI SVILUPPO DELLA POPOLAZIONE BATTERICA

La crescita di una coltura batterica rappresenta un processo di divisione sequenziale delle cellule della coltura per formare due cellule figlie identiche (Pletnev et al., 2015). La curva di crescita batterica è composta da cinque fasi distinte (Fig. 5):

I. *Lag phase*: fase che intercorre tra l'inoculazione e l'inizio della moltiplicazione. In questa fase si ha un'assenza quasi totale della crescita batterica in quanto si ha una fase di adattamento del metabolismo cellulare alle condizioni del nuovo habitat;

II. *Logarithmic phase*: dopo essersi adattati i batteri iniziano a moltiplicarsi in modo esponenziale, la popolazione batterica raddoppia ad ogni generazione. Il tasso di crescita è massimo in questa fase;

III. *Stationary phase*: i batteri entrano in questa fase quando i nutrienti nel terreno iniziano ad esaurirsi. È caratterizzata da un equilibrio tra il numero di cellule che si dividono e quelle che muoiono ed è rappresentata da un plateau nella curva di crescita (Pletnev et al., 2015);

IV. *Death phase*: le cellule iniziano a perdere vitalità, segnando la transizione dalla fase stazionaria alla fase di morte proprio a causa della mancanza di nutrienti ma anche a causa della presenza di cataboliti tossici, superando il numero delle cellule che riescono a sopravvivere;

V. *Long-term stationary phase (LTSP)*: le cellule morte rilasciano nutrienti nell'ambiente e i sopravvissuti possono utilizzare queste sostanze per la loro sopravvivenza, portando la coltura batterica a uno stato di fase stazionaria a lungo termine, con una vitalità che si mantiene per diverse settimane e persino mesi. Questa fase è un periodo altamente dinamico in cui i tassi di "nascita" e di "morte" sono in equilibrio (Llorens et al., 2010).

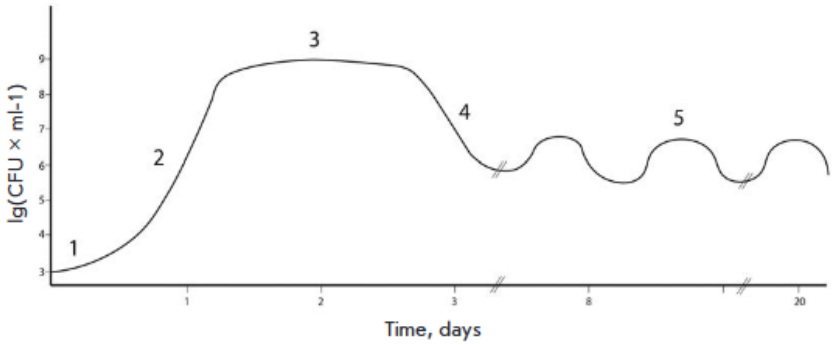

Figura 5: Curva di crescita batterica. 1- lag phase; 2- log phase; 3- stationary phase; 4- death phase; 5- long-term stationary phase (Pletnev et al., 2015)

1.5.1. FENOMENI ASSOCIATI ALLA LTSP

Vi sono diversi fenomeni associati alle colture in *long-term stationary phase* (LTSP) che verranno affrontati di seguito: il fenotipo GASP, l'inibizione contatto-dipendente in fase stazionaria (SCDI), lo stato VBNC e la condizione di *persister*.

Il **fenotipo GASP** (*growth advantage in stationary phase phenotype* - fenotipo con vantaggio di crescita in fase stazionaria) è un fenotipo di crescita attiva e competitiva, è una strategia in cui i mutanti acquisiscono la capacità di crescere utilizzando le risorse rilasciate da cellule morte. Esso è definito dalla capacità delle cellule, invecchiate in colture batch a lungo termine, di avere un vantaggio competitivo sulle cellule provenienti da colture più giovani e si spiega con il fatto che nella popolazione batterica compaiono cellule mutanti più adatte a crescere in queste condizioni rispetto al ceppo parentale. Il vantaggio competitivo è determinato geneticamente e non è dovuto all'adattamento fisiologico all'ambiente della fase stazionaria. Ciò è stato dimostrato in due modi. In primo luogo, i ceppi "evoluti" mantengono il fenotipo GASP anche dopo ripetuti cicli di passaggi seriali in fase di crescita logaritmica. In secondo luogo, le mutazioni GASP possono essere create in ceppi "giovani" e "*naïve*" (mai esposti prima), trasferendo istantaneamente il fenotipo GASP a cellule che non sono mai state invecchiate (Zambrano et al., 1993). La prima mutazione GASP identificata era a carico del gene *rpoS*, che codifica per il fattore sigma (σ) alternativo RpoS o σs. Ulteriori mutazioni sono state mappate a carico di *lrp* e del cluster *ybeJ–gltJKL*, che codificano rispettivamente per la proteina sensibile alla leucina e per un trasportatore ad alta affinità per l'aspartato e il glutammato. Sebbene ciascuno di questi geni sia coinvolto in processi diversi, ogni mutazione GASP si traduce in una maggiore capacità di catabolizzare uno o più amminoacidi come fonte di carbonio ed energia (Zinser & Kolter, 2004). Questi mutanti si nutrono attivamente degli amminoacidi rilasciati nell'ambiente dalle cellule morte e Zinser e i suoi collaboratori (2004) hanno dimostrato che le mutazioni GASP in *rpoS*, così come in diversi altri geni, possono aumentare la capacità di utilizzare alanina, arginina, aspartato, glutammato, glutammina, serina, treonina e prolina come uniche fonti di carbonio ed energia, conferendo un significativo vantaggio competitivo ai mutanti. Un riarrangiamento genomico porta alla disattivazione di un gene che codifica per una permeasi degli oligopeptidi e all'attivazione di un operone che codifica per i trasportatori degli acidi glutammico e aspartico. Pertanto, perdendo la capacità di degradare gli oligopeptidi, la cellula acquisisce una maggiore capacità di nutrirsi degli amminoacidi monomerici rilasciati nel terreno dalle cellule morte. Dopo un'ulteriore incubazione, nelle cellule che già presentano una mutazione nel gene *rpoS* si attiva l'operone *bgl*, un sistema regolatorio dei batteri che controlla l'espressione genica per enzimi coinvolti nel metabolismo dei β-glicosidi, il quale porta alla comparsa di una popolazione in grado di utilizzare come risorsa i β-glicosidi (Llorens et al., 2010). Questa costante comparsa di mutazioni GASP nel tempo indica che le colture in fase stazionaria a lungo termine non sono statiche, ma altamente dinamiche. I ceppi isogenici portano singole mutazioni puntiformi che conferiscono resistenza agli antibiotici,

solitamente una mutazione in *gyrA* che conferisce resistenza all'acido nalidixico e una mutazione in *rpsL* che conferisce resistenza alla streptomicina. Queste mutazioni permettono di identificare le cellule provenienti da colture "giovani" rispetto a quelle "vecchie". Dopo che le colture sono state invecchiate e i mutanti GASP sono comparsi nella popolazione, numeri uguali di cellule vengono mescolati insieme. Le sottopopolazioni vengono quindi monitorate attraverso i loro fenotipi di farmaco-resistenza. Mentre queste colture miste vengono co-incubate, il numero totale di cellule per coltura non cambia; tuttavia, la proporzione delle due sottopopolazioni marcate aumenterà o diminuirà nel tempo, portando frequentemente uno dei due gruppi a estinguersi. Anche se la popolazione batterica sembra numericamente stabile, al suo interno c'è un continuo ricambio: i mutanti GASP, che sono più "forti", si moltiplicano a spese delle cellule meno adatte, che vengono eliminate. In questo modo, il numero totale di cellule rimane costante, ma la composizione della popolazione si evolve diventando sempre più competitiva, come mostrato in Figura 6 (Finkel, 2006).

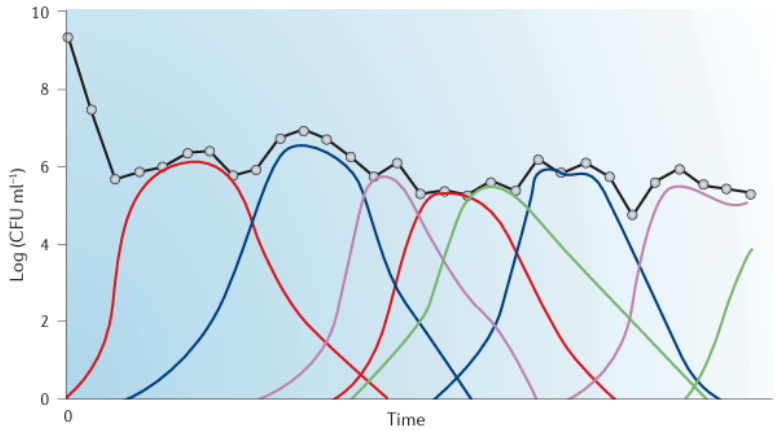

Figura 6: Equilibrio dinamico tra i mutanti GASP e le cellule meno competitive. I tassi di nascita e di morte all'interno della popolazione sono in equilibrio. Ogni linea colorata rappresenta un diverso mutante GASP che compare durante l'incubazione a lungo termine. La linea nera rappresenta la densità totale della popolazione.

L'**inibizione contatto-dipendente in fase stazionaria** (**SCDI**) è una forma diffusa di competizione batterica mediata dalle proteine effettrici CdiA. La proteina CdiA è esposta sulla superficie della cellula inibitrice e, al contatto, trasferisce la sua regione tossica C-terminale (CdiA-CT) nei batteri vicini. Molte specie di batteri Gram-negativi utilizzano le proteine effettrici CdiA per inibire la crescita dei competitori vicini. Le proteine CdiA trasportano una varietà di domini tossici che vengono trasferiti direttamente nei batteri bersaglio al contatto tra le cellule. Le cellule che producono CdiA si proteggono dall'auto-inibizione grazie alle proteine di immunità CdiI, che neutralizzano specificamente l'attività della tossina. Il gruppo di lavoro di Halvorsen (2024) ha descritto una nuova famiglia di tossine CdiA che bloccano la produzione di energia nei batteri bersaglio, dissipando il potenziale elettrico transmembrana. Sebbene queste tossine condividano la stessa attività, sono altamente variabili in sequenza e sembrano entrare nelle

membrane delle cellule bersaglio utilizzando vie molecolari diverse. Le proteine CdiI associate mostrano un polimorfismo di sequenza ancora maggiore, e ogni proteina di immunità protegge solo contro la sua tossina corrispondente. La specificità di questa rete di interazione tossina-immunità permette alle cellule che esprimono CdiA di distinguere se i batteri vicini sono geneticamente identici o non identici. Questo meccanismo di discriminazione tra *self* e *non-self* può determinare se le popolazioni batteriche intraprendano interazioni antagonistiche o collaborative. In concomitanza con la riduzione dei livelli di ATP la CDI induce riduzioni significative della respirazione, della forza proton-motrice (pmf) e il blocco della crescita cellulare (Hayes & Low, 2009). L'espressione di CdiI nelle cellule bersaglio è sufficiente per la protezione dalle cellule inibitrici CDI+. La CDI condivide delle caratteristiche con il fenomeno VBNC, in quanto le cellule inibite dalla CDI escludono lo ioduro di propidio (un colorante che entra solo nelle cellule morte) e la loro crescita può essere indotta in condizioni specifiche (Aoki et al., 2009). Poiché le cellule inibite dalla CDI sono metabolicamente sottoregolate, la CDI potrebbe essere un meccanismo che permette ai batteri di "nascondersi" all'interno dei tessuti dell'ospite o dell'ambiente.

Un altro fenomeno associato alla LTSP è lo **stato di VBNC** (*viable but nonculturable* - vitale ma non coltivabile), cioè una popolazione di cellule con un fenotipo che si manifesta come risposta a una varietà di stress come ad esempio mancanza di nutrienti, temperature e pH non ottimali, livelli bassi d'ossigeno, stress osmotico e radiazioni UV. Ad oggi, è stato determinato che più di 100 specie di microrganismi sono entrate nello stato VBNC a causa di numerosi fattori chimici e fisici, tra cui anche *Pseudomonas* (İzgördü et al., 2022). Le cellule in stato VBNC cambiano morfologia e struttura della membrana cellulare, la sintesi proteica, l'espressione genica, l'attività respiratoria e molte altre caratteristiche (Zhu et al., 2021). Per quanto riguarda i cambiamenti della morfologia, essi sono associati alle modifiche delle componenti della membrana cellulare come la membrana citoplasmatica, gli acidi grassi, peptidoglicani e lipoproteine. Queste modifiche aumentano la stabilità della membrana cellulare nelle cellule VBNC, inoltre vi sono altre differenze fisiologiche e molecolari con le cellule coltivabili come, ad esempio, la quantità di RNA, l'espressione genica, il profilo proteico, la sintesi di ATP e molto altro ancora (İzgördü et al., 2022). Probabilmente, in questo modo la cellula tenta di far fronte allo stress attraverso una sorta di "ibernazione" e di isolarsi dall'ambiente avverso tramite una barriera impermeabile. La natura molecolare del meccanismo del fenotipo VBNC non è stata identificata del tutto, ma è chiaro che esso va oltre una singola via regolatoria e implica un cambiamento globale del metabolismo cellulare (Pletnev 2015). I batteri VBNC non sono in grado di crescere su un comune terreno di coltura, pur mantenendo attive le loro funzioni vitali e metaboliche. Quando le condizioni ambientali tornano ad essere favorevoli, a seguito di uno stimolo specifico le cellule VBNC diventano nuovamente coltivabili (Oliver, 2000). Tuttavia, gli stimoli che permettono alle cellule VBNC di tornare allo stato attivo sono diversi nei diversi gruppi di batteri e spesso ancora non caratterizzati (Ayrapetyan

et al., 2015). Le cellule VBNC non possono essere individuate mediante metodi di coltura convenzionali in quanto non possono essere coltivati, di conseguenza sono stati sviluppati metodi che ne rilevano la vitalità come ad esempio l'attività metabolica, l'integrità della membrana cellulare e l'attività respiratoria.

Concludendo, la fase LTSP può portare allo sviluppo dei cosiddetti ***persisters***. Più di 70 anni fa, i ricercatori Hobby e Bigger osservarono che gli antibiotici considerati battericidi non riuscivano a sterilizzare completamente le colture batteriche. Fu Joseph Bigger, in particolare, a coniare nel 1944 il termine *persisters* per descrivere questa piccola sottopopolazione sopravvissuta. Egli definì "persistenti" le cellule di *Staphylococcus aureus* che erano sopravvissute a un trattamento con penicillina, pur appartenendo a una popolazione geneticamente suscettibile. La prova della loro natura non resistente risiedeva nel fatto che, una volta ricresciute, queste cellule davano origine a una nuova popolazione che era di nuovo sensibile all'antibiotico (Hobby et al., 1942; Bigger, 1944). I *persisters* sono cellule batteriche che rappresentano una sottopopolazione di cellule che può sopravvivere a un trattamento antibiotico intensivo senza essere resistente, sono cioè delle varianti batteriche geneticamente identiche a cellule suscettibili all'interno di una popolazione clonale che sviluppano però un fenotipo resistente a trattamenti transienti di antibiotici o di altro genere, generalmente sufficienti ad eliminare batteri suscettibili (Balaban et al., 2019). La condizione di persister è stata identificata in quasi tutte le specie batteriche, si hanno avuto riscontri anche in popolazioni di microrganismi eucarioti, come il lievito, che ha mostrato tolleranza agli antimicotici (Van Den Bergh et al., 2017). Lo stato dei *persisters* è spesso associato ad un fallimento di trattamenti antibiotici. La persistenza agli antibiotici si riferisce specificamente a quella risposta non uniforme delle popolazioni batteriche (sia in laboratorio che nell'ospite) che ha come conseguenza un'eliminazione più lenta della carica batterica durante un trattamento antibiotico (Figura 7; Balaban et al., 2019).

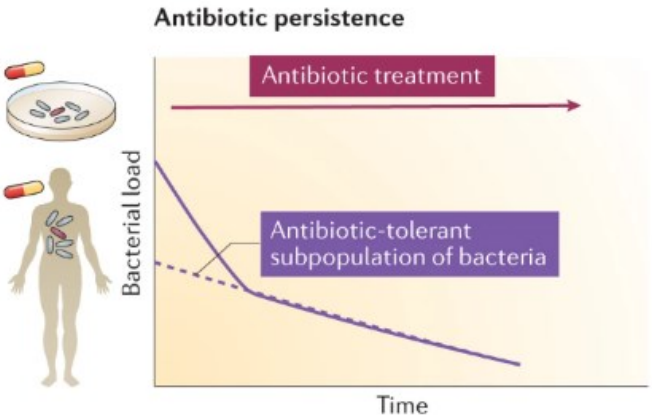

Figura 7: Persistenza antibiotica (Balaban et al., 2019)

Nella maggior parte degli studi sulla persistenza la frazione di batteri *persister* si genera in risposta a un segnale di stress, il più comune dei quali è la carenza di nutrienti (*starvation*). Questo tipo di persistenza viene definito persistenza indotta (*triggered persistence*). Anche quando si permette alla coltura di riprendere la crescita per alcune ore fino a raggiungere quella che sembra essere la "crescita esponenziale", una frazione dei *persister* indotti dalla precedente carenza di nutrienti può rimanere in una fase di latenza (*lag phase*). Pertanto, la distribuzione del tempo di latenza delle singole cellule dopo la carenza di nutrienti o l'esposizione a uno stress è un fattore importante da tenere in considerazione. Molte condizioni di stress possono essere la causa di una persistenza indotta, tra cui la limitazione di diversi nutrienti, l'elevata densità cellulare, lo stress acido, i fattori immunitari e l'esposizione a cellule immunitarie. La persistenza può essere anche spontanea, cioè quando viene osservata senza alcun innesco, e i *persister* possono comparire spontaneamente e la loro frazione rimane costante finché viene mantenuta la crescita in stato stazionario (Figura 8).

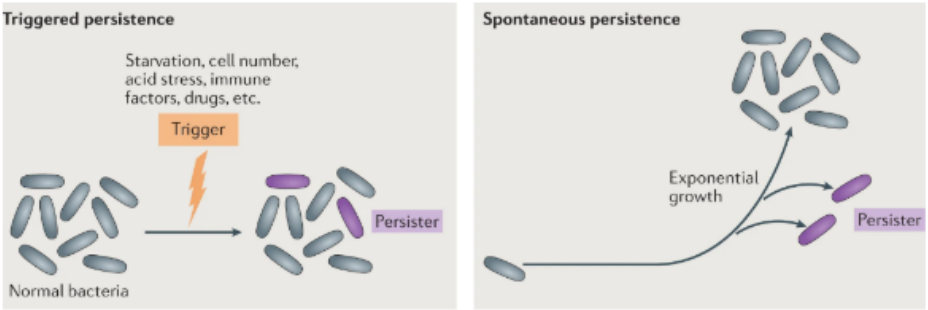

Figura 8: Persistenza spontanea e indotta (Balaban et al., 2019)

È importante distinguere la persistenza batterica dalla resistenza batterica. La 'resistenza' è la capacità dei batteri di replicarsi, e non semplicemente di sopravvivere, in presenza di un farmaco. La misura più comune del livello di resistenza è la minima concentrazione inibente (MIC), che è la più bassa concentrazione di antibiotico necessaria per impedire la replicazione dei batteri. Una MIC più alta corrisponde a un livello di resistenza più elevato. La resistenza è un carattere ereditario e può essere acquisita tramite trasferimento genico orizzontale di geni che codificano per la resistenza o tramite mutazioni che conferiscono il fenotipo di resistenza alla popolazione batterica (Blair et al., 2014). Facendo riferimento alla Figura 9, che rappresenta l'andamento di un trattamento antibiotico con particolare distinzione tra cellule resistenti e cellule persistenti, in entrambi i casi le cellule sensibili (grigio) vengono eliminate rapidamente (prima zona rossa), con una dinamica di mortalità molto simile (freccia ripida). La differenza cruciale emerge durante il trattamento, in cui i mutanti resistenti possono continuare a replicarsi, mentre i *persister* si limitano a sopravvivere. Una volta rimosso l'antibiotico, entrambi i gruppi di sopravvissuti riprendono a dividersi, anche se i *persister* mostrano un tempo di latenza più lungo. I *persister* generano una nuova popolazione sensibile come quella di partenza, perché la loro

tolleranza non è un carattere ereditario. Al contrario, i mutanti resistenti danno origine a una popolazione interamente resistente. Questa distinzione fondamentale determina l'esito di un secondo trattamento antibiotico (Van Den Bergh et al., 2017).

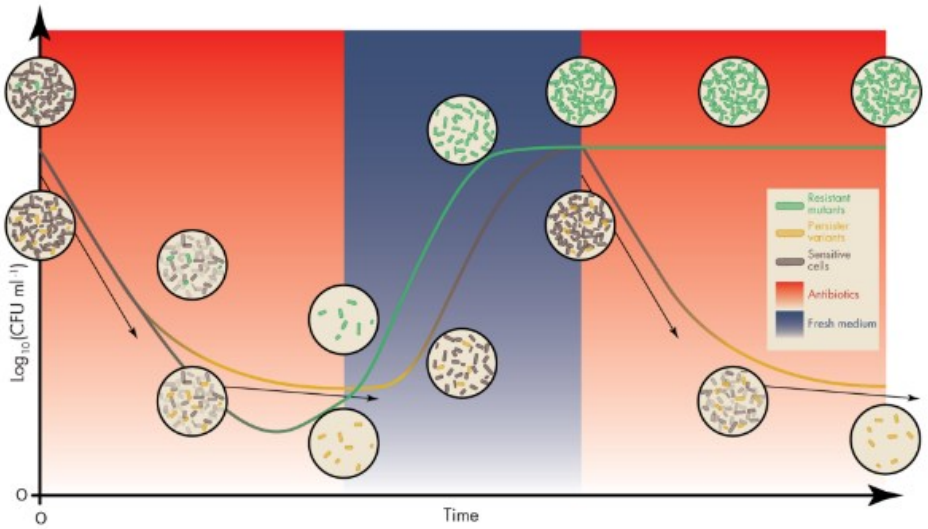

Figura 9: Curva di crescita che mostra il diverso comportamento di cellule persisters e cellule resistenti ad un trattamento antibiotico (Van Den Bergh et al., 2017)

1.6. MECCANISMI MOLECOLARI DI PERSISTENZA

I meccanismi di formazione delle cellule persister non sono ancora del tutto chiariti, poiché esse sono presenti in numero esiguo, eterogenee, transitorie e possono variare in base al tipo di stress e di ambiente. È stato dimostrato che la formazione di sottopopolazioni di cellule persister può essere indotta da una varietà di condizioni ambientali, tra cui la carenza di nutrienti, le transizioni della fonte di carbonio, la risposta SOS indotta da danno al DNA e l'esposizione agli antibiotici (Abee et al., 2016).

1.6.1. SISTEMA TOSSINA-ANTITOSSINA (TA)

Nella formazione di cellule persister un ruolo cruciale è svolto dai cosiddetti sistemi tossina-antitossina (TA). Questi possono essere attivati da una serie di condizioni ambientali, inclusa la produzione dell'allarmone intracellulare (p)ppGpp. Questa molecola, tipicamente indotta da carenza di nutrienti, attiva la cosiddetta risposta stringente, che verrà descritta in seguito. Altri tipi di sistemi TA, come i sistemi TA di Tipo II, influenzano la fisiologia cellulare tramite modulatori proteici e/o di RNA. I sistemi tossina-antitossina (TA) sono composti da una tossina stabile e da un'antitossina labile che la neutralizza legandosi direttamente ad essa (Figura 10). La tossina, se non inibita, arresta la crescita cellulare interferendo con processi vitali come la sintesi proteica o della parete cellulare. Un'eccessiva espressione della tossina, infatti, induce efficacemente uno stato dormienza, dal quale le cellule possono essere riattivate ("risuscitate") grazie all'azione dell'antitossina in risposta a cambiamenti ambientali (Goeders & Van Melderen, 2014).

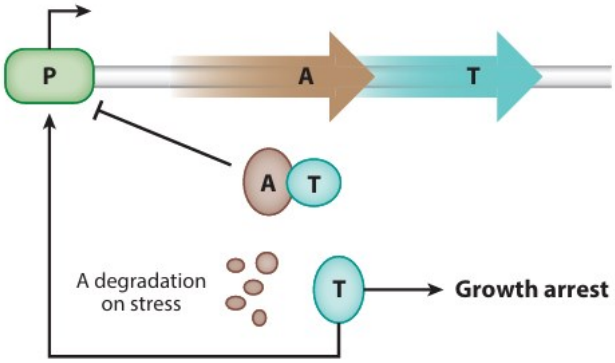

Figura 10: Rappresentazione schematica dell'azione dei sistemi TA. Il legame dell'antitossina (A, marrone) alla tossina (T, blu) previene l'azione di quest'ultima e reprime la trascrizione sia del gene della tossina che di quello dell'antitossina. In condizioni di stress, l'antitossina viene degradata e la tossina libera può attivare la trascrizione a partire dal promotore (P), inducendo l'arresto della crescita (Abee et al., 2016).

Le antitossine sono o RNA antisenso, che sopprimono l'espressione della tossina, o proteine labili che si legano alla loro tossina e la inattivano. A seconda della natura dell'antitossina (RNA o proteina) e del modo in cui essa contrasta la tossina (inibendone la sintesi o l'attività), i sistemi TA possono essere suddivisi in sottotipi, dei quali ne sono stati attualmente descritti sei (Page & Peti, 2016). Il Tipo II è il più comune e quello più frequentemente associato alla persistenza. In questi sistemi, l'antitossina è una proteina che si lega alla proteina tossina, neutralizzandone l'effetto e, allo stesso tempo, reprimendo la trascrizione dell'operone TA (Van Den Bergh et al., 2017). Le antitossine codificate dai sistemi TA proteici agiscono anche come repressori trascrizionali che autoregolano l'espressione dei geni TA. È stato anche proposto che i moduli TA cromosomici funzionino come regolatori della crescita cellulare in risposta a stress ambientali. In *E. coli*, la degradazione dell'antitossina mediata dalle proteasi Lon e ClpAP è indotta dalla carenza di nutrienti e da altre condizioni che inibiscono la trascrizione e la traduzione. L'interazione precisa delle tossine con i loro bersagli è ancora in gran parte sconosciuta, ma generalmente provoca l'alterazione di attività cellulari essenziali come la traduzione o il metabolismo del DNA, al fine di bloccare il metabolismo o uccidere la cellula (Figura 11).

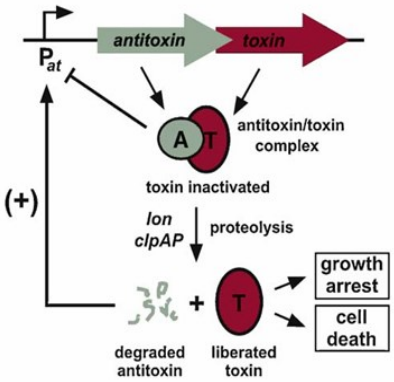

Figura 11: Organizzazione moduli TA (Hayes & Low, 2009)

Nella maggior parte dei casi, le tossine liberate sono RNasi che tagliano preferenzialmente l'mRNA, le quali inibiscono la sintesi proteica e arrestano rapidamente la crescita. Secondo questo modello, lo stress ambientale provoca un'attivazione transitoria della tossina, che blocca rapidamente la sintesi proteica fino al ritorno di condizioni più ospitali (Jørgensen et al., 2008). Il primo gene legato alla persistenza a essere identificato è *hipA* (*high persistence gene A*) di *E. coli* (Moyed & Bertrand, 1983), che codifica per la parte tossica di un modulo TA di tipo II, HipBA. Come altri moduli TA di tipo II, l'antitossina HipB inattiva la tossina HipA attraverso un forte legame. Questa inattivazione è il risultato di un'inibizione diretta tramite interazione fisica. Infatti, il complesso HipBA autoregola l'espressione di *hipBA* legandosi a quattro siti nel suo promotore. L'espressione di *hipA7*, un allele mutante di *hipA* che contiene le sostituzioni amminoacidiche G22S e D291A, porta a un aumento di oltre 1000 volte del numero di persister (Moyed and Bertrand 1983), mentre la modifica del rapporto HipA:HipB tramite la sovraespressione di *hipA* (ma non di *hipB*) aumenta anch'essa i livelli di persister. Entrambe le osservazioni suggeriscono che la proteina HipA libera possa indurre le cellule a passare allo stato di persister (Feng et al., 2013). Osservazioni a livello di singola cellula dei livelli di HipA, condotte da Rotem et al. (2010), hanno rivelato l'esistenza di una soglia di concentrazione di HipA al di sopra della quale le cellule diventano persister e al di sotto della quale rimangono normali. Inoltre, è stato riscontrato che la durata della tolleranza risultante è correlata all'entità con cui la concentrazione di HipA supera tale livello di soglia. Questo livello dipende in parte dalla concentrazione di HipB ma anche dall'affinità di legame tra HipB e HipA, come evidenziato dalla minore affinità di legame di HipA7 rispetto a HipA.

1.6.2. RISPOSTA STRINGENTE DA MANCANZA DI NUTRIENTI E (p)ppGpp

Il (p)ppGpp è un metabolita-segnale prodotto in condizioni di stress (come carenza di nutrienti, presenza di antibiotici o variazioni di temperatura e pH) che modifica l'espressione di numerosi geni, rallentando la crescita cellulare (Van den Bergh B. et al., 2017). È stato infatti osservato che i mutanti nei geni chiave per la produzione di (p)ppGpp mostrano una ridotta capacità di entrare nello stato di persistenza (Viducic et al., 2006). Il (p)ppGpp viene prodotto durante la carenza di amminoacidi o acidi grassi da proteine. Pertanto, in risposta a stress come la carenza di amminoacidi, nei batteri Gram-negativi, il (p)ppGpp si lega alla RNA polimerasi, inducendo un segnale allosterico al sito catalitico del Mg^{2+}, che riduce drasticamente la trascrizione e causa una riprogrammazione globale del profilo di espressione genica. Nel complesso, tutti questi cambiamenti portano alla dormienza o a una crescita lenta per la maggior parte delle cellule (Liu et al., 2015). Un aumento dei livelli di (p)ppGpp inibisce il superavvolgimento negativo del DNA in *E. coli*, impedendo così la replicazione e la trascrizione del DNA, il che si traduce in tolleranza verso l'ofloxacina e i chinoloni. Le cellule persistenti tendono a formarsi nei biofilm, in cui le cellule batteriche sono immerse in una matrice tridimensionale che fornisce protezione durante la patogenesi e in altre condizioni. È quindi logico che i batteri nei biofilm abbiano un accesso

limitato ai nutrienti e di conseguenza attivino la Risposta Stringente (SR). L'accumulo di (p)ppGpp promuove alterazioni trascrizionali nella cellula batterica, come la repressione generale dei geni associati alla crescita rapida e l'attivazione di geni coinvolti nella biosintesi degli amminoacidi e nella sopravvivenza allo stress (Pacios et al., 2020). Nel 2015, Yamaguchi e colleghi hanno scoperto che livelli elevati di (p)ppGpp portavano all'inibizione della crescita batterica interferendo con l'assemblaggio della proteina FtsZ in *Salmonella enterica* sierovar Paratyphi A. FtsZ è una proteina essenziale per la divisione cellulare procariotica che deve formare strutture lineari e possiede un sito di legame per il GTP; tuttavia, livelli aumentati di (p)ppGpp (20 volte superiori ai livelli di GTP richiesti) fanno sì che FtsZ formi strutture elicoidali che compromettono la divisione della cellula batterica e, di conseguenza, la crescita della popolazione.

1.6.3. INTERAZIONE TRA (p)ppGpp ED ALTRI MECCANISMI MOLECOLARI

La Risposta Stringente funge da snodo centrale, collegando la percezione dello stress ad altri meccanismi effettori della persistenza, come i sistemi TA, le pompe di efflusso e la risposta allo stress ossidativo (ROS). La connessione tra (p)ppGpp e sistemi TA è ben documentata. Già nel 1996, si osservò che la tossina MazF richiedeva (p)ppGpp per la sua attivazione. Successivamente, si scoprì che l'alta persistenza del mutante hipA7 veniva quasi completamente abolita in ceppi incapaci di produrre (p)ppGpp, suggerendo che la tossina HipA agisca inducendo la sintesi dell'alarmone. Il modello oggi più accreditato, proposto da Germain e colleghi (2013), sostiene che HipA fosforili la glutammil-tRNA-sintetasi (GltX). Questo blocco crea tRNA non carichi che, arrivando al ribosoma, attivano la sintesi di (p)ppGpp da parte di RelA, innescando la risposta stringente e la persistenza (Germain et al., 2013).

Le **pompe di efflusso** sono complessi proteici che permettono ai batteri di espellere tossine intracellulari o molecole di antibiotico. Alcuni geni che codificano per le pompe di efflusso sono sovraregolati nelle cellule che costituiscono i biofilm, che sono composti principalmente da cellule persistenti non in crescita. Questa sovraregolazione nelle cellule persistenti può essere innescata da diversi segnali, come la risposta ai ROS, il QS e il (p)ppGpp (Ge et al., 2018). Le **specie reattive dell'ossigeno (ROS)** sono prodotte come risposta naturale al normale metabolismo dell'ossigeno e svolgono importanti funzioni nella segnalazione cellulare e nell'omeostasi. Tuttavia, quando le cellule sono esposte a pressioni ambientali, come antibiotici, raggi UV o stress termico, i livelli di ROS possono aumentare; questo aumento può causare danni al DNA, ai lipidi e alle proteine, portando successivamente alla morte cellulare. Come tutti i meccanismi molecolari, i ROS sono soggetti a regolazione. Tra le molecole in grado di eliminare i ROS, troviamo enzimi, come la superossido dismutasi (SOD) e la catalasi, così come agenti antiossidanti, come il glutatione e la vitamina C. Tuttavia, quando si verifica un aumento dei livelli di ROS a causa di uno squilibrio tra i meccanismi di produzione ed eliminazione, si dice che le cellule sono soggette a stress ossidativo. La relazione tra la risposta ai ROS e i batteri persistenti è ampiamente descritta in

letteratura. Nguyen e colleghi, nel 2011, hanno mostrato che la sopravvivenza dei *persisters* multitolleranti nei biofilm di *P. aeruginosa* era in gran parte dipendente dagli enzimi catalasi o SOD, che sono sotto il controllo della segnalazione del (p)ppGpp (Nguyen et al., 2011).

2. SCOPO DELLO STUDIO/OBIETTIVI

P. fluorescens è in grado di adottare complesse strategie di sopravvivenza, tra cui la persistenza. La persistenza comporta l'evoluzione di fenotipi specializzati per sopravvivere in ambienti come quelli dell'azienda alimentare in cui la disponibilità di nutrienti e le condizioni possono essere non favorevoli. Tuttavia, non è ancora del tutto chiaro come le diverse condizioni di conservazione, come la refrigerazione (4°C) rispetto alla temperatura ambiente (22°C), influenzino i percorsi evolutivi a lungo termine e quali siano le precise basi genetiche di tali adattamenti. Comprendere queste dinamiche è fondamentale per sviluppare strategie di controllo più efficaci. Pertanto, l'obiettivo principale di questo lavoro di tesi è stato quello di investigare le strategie evolutive, a livello genetico e fenotipico, adottate da popolazioni di *Pseudomonas fluorescens* durante un'incubazione prolungata in condizioni di Long-Term Stationary Phase (LTSP), confrontando l'impatto di due diverse temperature di conservazione.

Per raggiungere questo scopo, il progetto si è sviluppato attraverso una caratterizzazione fenotipica delle popolazioni batteriche mantenute a 4°C e 22°C. Si sono monitorate nel tempo le dinamiche di vitalità tramite conte su piastra e si è indagata la formazione di sub-popolazioni dormienti, in particolare le cellule *Viable But Non-Culturable* (VBNC) e le cellule *persisters*. Parallelamente, sono state analizzate le variazioni di tratti funzionali chiave come la motilità (swimming e swarming) e i profili di crescita dei cloni isolati.

Per comprendere le basi genetiche di questi adattamenti, si è poi proceduto con il sequenziamento dell'intero genoma (WGS) di cloni selezionati dalle colture evolute e successive analisi bioinformatiche che hanno avuto lo scopo di identificare le mutazioni accumulate nel tempo e di mappare i geni e i percorsi metabolici.

Lo scopo ultimo di questo studio è stato quindi quello di correlare le alterazioni genetiche riscontrate con i cambiamenti fenotipici osservati, in modo da delineare i distinti percorsi evolutivi che *P. fluorescens* intraprende in risposta alle diverse condizioni di stress, fornendo così un quadro più chiaro dei meccanismi che ne guidano la persistenza e il potenziale alterativo negli ecosistemi alimentari.

3. MATERIALI E METODI

3.1. CEPPI BATTERICI

L'esperimento è stato condotto utilizzando 3 ceppi batterici di *Pseudomonas fluorescens* gruppo *fluorescens* forniti dall'Università di Padova, gruppo di ricerca della Dott.sa Barbara Cardazzo (Andreani et al, 2014):

I. Ceppo CECT 378: è il ceppo di riferimento ed è stato isolato da un campione prelevato da serbatoi prefiltranti di impianti idrici urbani nel Regno Unito (https://www.cect.org/vstrn.php?lan=en&cect=378);
II. Ceppo L3_4 (ps_20): isolato da latte UHT (Ultra High Temperature processing) in Italia;
III. Ceppo uk1 (ps_77): isolato da carne "Blue beef" in Inghilterra. Questo è l'unico ceppo in grado di produrre pigmento in questo esperimento.

All'interno del gruppo *fluorescens* ci sono i ceppi ps_20 e ps_77 che sono filogeneticamente lontani dal ceppo CECT ma sono molto vicini tra di loro, come si può vedere nella Figura 12.

Questo albero filogenetico è stato fatto in precedenza nel gruppo di ricerca dove ho svolto la tesi ed è stato fatto con PhyloPhlAn 3.0 e IQ-Tree2 utilizzando dei genomi scaricati in precedenza da NCBI.

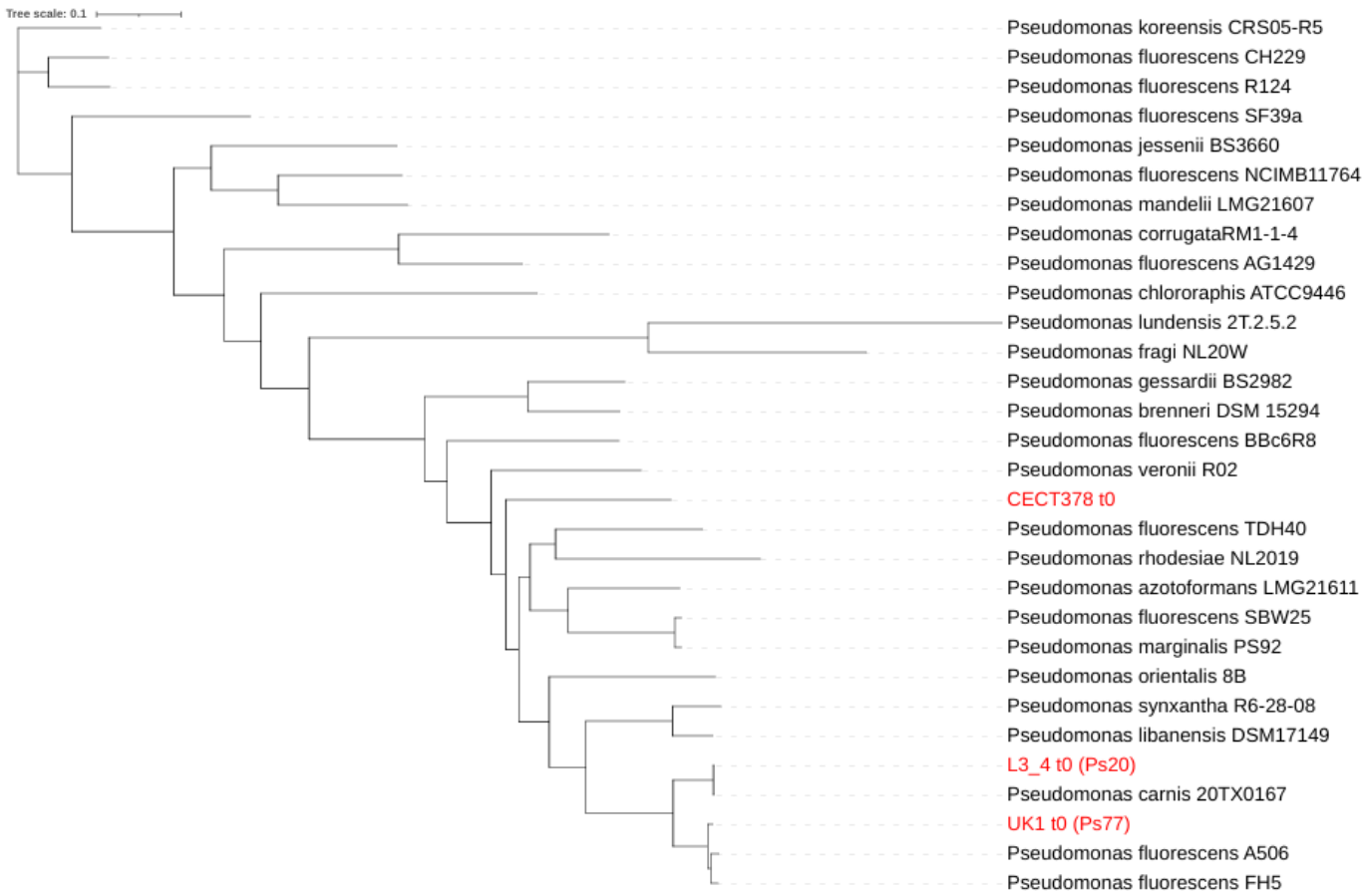

Figura 12: Albero filogenetico dei ceppi del genere Pseudomonas. I ceppi in rosso sono i ceppi utilizzati nell'esperimento.

3.2. PREPARAZIONE DELLE *Long-Term Cultures*

Per l'esecuzione dell'esperimento sono stati preparati, al tempo zero, dei tubi Falcon da 50 ml per ogni ceppo considerato nel capitolo precedente. Queste sono le "*Long-Term cultures*" che verranno monitorate nel tempo. I passaggi per ottenerle, uguali per tutti e 3 ceppi, sono stati i seguenti (Figura 13): i ceppi sono stati conservati a -80°C in criotubi contenenti Tryptone Soy Broth (TSB) con il 20% di glicerolo come crioprotettore. Per preparare le colture stock, i criotubi sono stati scongelati, piastrati su terreno selettivo PAB (Pseudomonas Agar Base) addizionato con CFC (Cetrimide, Fucidina e Cefaloridina) e incubati a 22°C (temperatura di crescita ottimale per *P. fluorescens*) per una notte. Il giorno successivo, sono state prelevate colonie pure e inoculate in 3 ml di terreno di crescita TSB+YE (Tryptone Soy Broth + Yeast Extract). È stato verificato che la OD_{600nm} (Densità Ottica a una lunghezza d'onda di 600 nm) fosse circa 0,35. Da prove preliminari precedenti si è visto che questo valore corrisponde a 10^8 cell/ml. A partire da questa densità iniziale, sono state preparate delle diluizioni seriali in TSB fino a 10^3 cell/ml e 1 ml di quest'ultima è stato inoculato in 39 ml di TSB+YE (Tryptone Soy Broth + Yeast Extract) a 22°C per 22 ore. Il giorno seguente, il terreno è stato rimosso mediante lavaggio con 30 ml di PBS (soluzione salina tamponata con fosfato) attraverso una serie di centrifugazioni (a 3500 rpm per 15 minuti) e, infine, le cellule sono state risospese in 40 ml di MBM (Minimal Bacterial Medium).

Riassumendo, sono stati preparati i tubi Falcon contenenti 40 ml ciascuna di MBM e coltura cellulare di ognuno dei tre ceppi, per un totale di quindici Falcon stock della madre (5 repliche per ciascun ceppo). L'MBM fornisce solo i nutrienti minimi per la sopravvivenza (glucosio e minerali). Per monitorare lo sviluppo delle popolazioni batteriche in condizioni di stress nutritivo, le Falcon sono state mantenute in incubazione a 22°C. Sono state preparate poi altre 15 Falcon madre (seguendo lo stesso protocollo descritto sopra) per la conservazione a lungo termine a 4°C, al fine di aggiungere un secondo fattore di stress (la temperatura di refrigerazione).

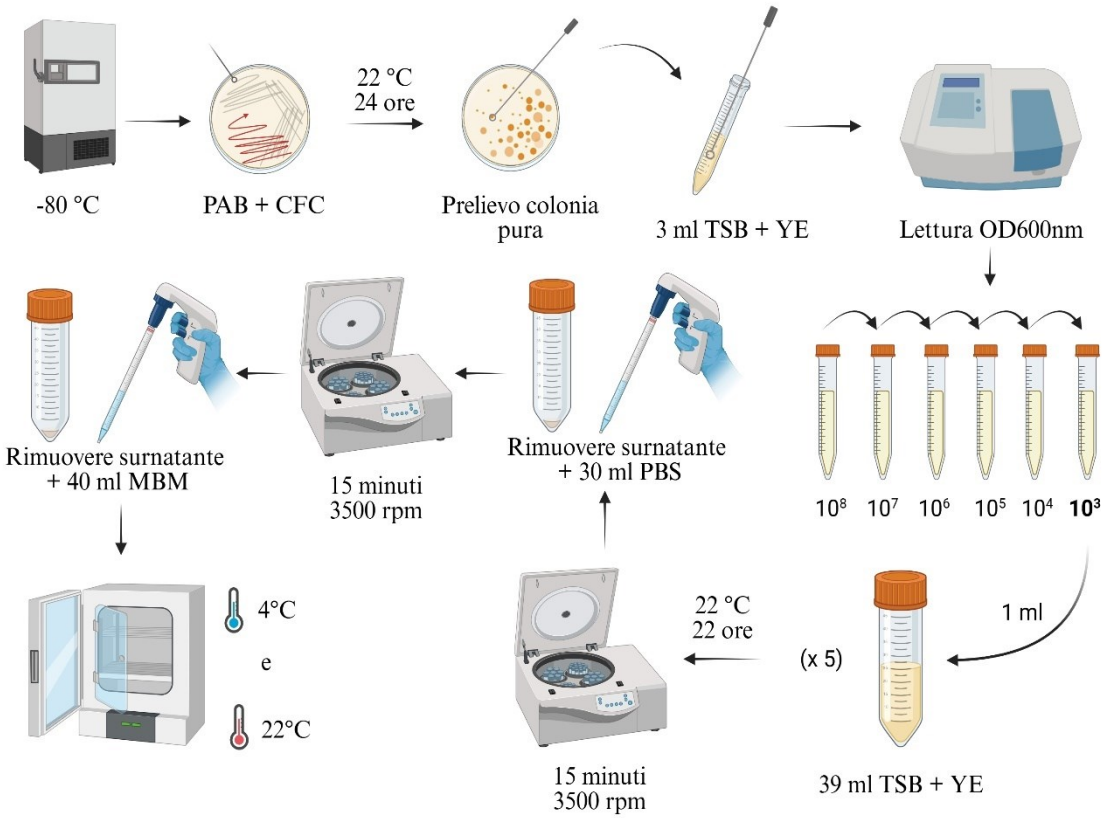

Figura 13: Preparazione Long-Term cultures (immagine realizzata con BioRender.com)

3.3. SCHEMA DELL'ESPERIMENTO

Le colture sono state monitorate e sono state eseguite numerose prove a diversi punti temporali. Come si può vedere dalla *timeline* dell'esperimento in Figura 14, io mi sono occupata della valutazione delle crescite cellulari, dei VBNC e dei *persisters* al tempo di 2 anni dalla partenza dell'esperimento e ho concluso le fasi che mancavano sui campioni di 1 anno (punti evidenziati in verde). Ho successivamente preparato le librerie per il sequenziamento dei tempi 1 anno e 2 anni e, infine, ho elaborato i dati NGS che erano già stati prodotti in laboratorio precedentemente. L'esperimento è tuttora in corso.

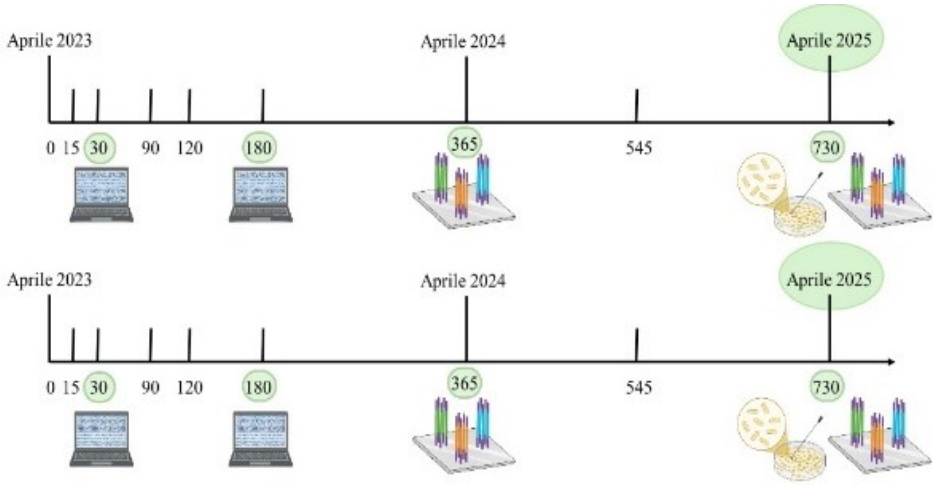

Figura 14: Timeline esperimento (immagine realizzata con BioRender.com). 0, 15, 30, 90, 120, 180, 365, 545 e 730 giorni sono i vari punti temporali di prelievo in cui sono stati prelevati i campioni per effettuare le analisi.

Come detto in precedenza, in seguito alla preparazione delle colture esse sono state monitorate: al tempo zero, dopo 15, 30, 90, 120, 180 giorni, dopo 1 anno, un anno e mezzo e dopo 2 anni. Per ognuno di questi tempi sono state prelevate delle aliquote che a loro volta sono state suddivise per diverse analisi. Le analisi sono state svolte sia sulle colture conservate a 4°C che su quelle conservate a 22°C e sono le seguenti (Figura 15):

- **Stoccaggio in glicerolo**: ad 1 mL di coltura prelevati dalla Falcon aggiungere 300 µL di glicerolo con una pipetta Pasteur sterile. In seguito ad un passaggio con vortex porre il tubino con tappo a vite in congelatore a -80°C. Lo stoccaggio in glicerolo, noto come crioconservazione, protegge le cellule dai danni del congelamento, permettendo loro di rimanere vitali per lunghi periodi di tempo e in questo modo si conserva il campione per eventuali analisi future.

Prelevare 1 mL di coltura *Long-Term* e suddividerlo per le prove successive in questo modo:

- **Diluizioni per conte**: a 100 µL di coltura *Long-Term* aggiungere 900 µL di MRD. Fare diluizioni seriali prelevando 100 µL e addizionandoli a 900 µL di MRD. Piastrare100 µL delle diluizioni -4, -5 e -6 in terreno CFC preparato precedentemente e incubare le piastre;
- **RNA**: centrifugare 250 µL di coltura *Long-Term* per 5 minuti a 5000 rpm. Eliminare il surnatante e aggiungere 250 µL di RNA *later*. Conservare a -80°C;
- **PMAxx (per DNA per vedere VBNC)**: aggiungere a 200 µL di coltura *Long-Term* il DYE e il PMA *enhancer*. Attendere 5 minuti di incubazione. Mettere le eppendorf per 15 minuti in lampada *PMA-Lite LED Photolysis Device* (BIOTIUM) che permette al DYE di fissarsi al DNA (intensifica il legame). Conservare le eppendorf a -20°C;
- **Antibiotico kanamicina (per persister)**: addizionare 100 µL di coltura *Long-Term* a 100 µL di madre dell'antibiotico kanamicina;

- **Motilità**: su terreno TSB (Tryptone Soy Broth) 0,3% agar (TSA) mettere 3 µL di coltura *Long-Term* in ciascuna piastra all'interno del terreno (*swimming*). Suddividere la piastra con terreno TSB 0,6% agar in tre sezioni e mettere 3 µL di coltura *Long-Term* in ciascuna sezione sopra il terreno (*swarming*). Mettere le piastre a 4°C per 7 giorni oppure a 22°C per 24 ore.

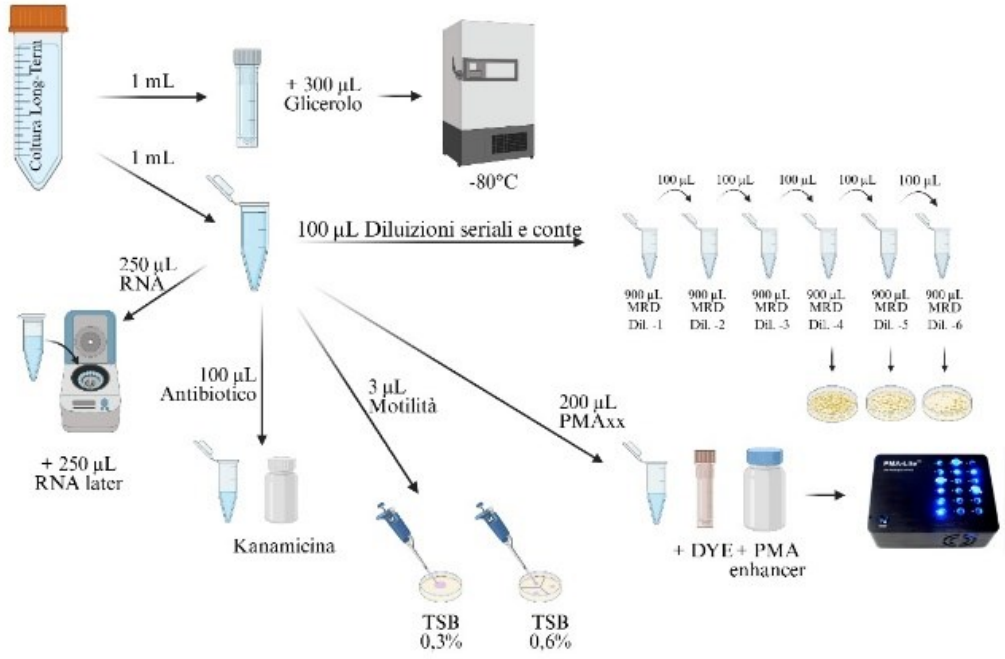

Figura 15: Analisi effettuate su colture Long-Term (immagine realizzata con BioRender.com)

3.4. ANALISI SULLE COLTURE DI 2 ANNI A 4°C E 22°C

3.4.1. CONTE BATTERICHE SU PIASTRE E GENERAZIONE CURVE DI CRESCITA

Per monitorare la capacità di crescita sotto stress nel tempo e lo sviluppo delle colture batteriche in terreno minimo, sono state fatte diluizioni seriali (dalla -1 alla -6) patendo da 100 µL di coltura *Long-Term* e addizionandoli a 900 µL di MRD (Maximum Recovery Diluent). Successivamente sono stati piastrati 100 µL delle diluizioni -4, -5 e -6 (concentrazioni determinate in base ai precedenti risultati) in terreno selettivo CFC preparato precedentemente e le piastre sono state poste ad incubare a 22°C (temperatura ottimale di crescita di *Pseduomonas*) per 48 ore (Figura 16). Al terreno CFC, per ogni bottiglia, è stato aggiunto 1 flacone di *Pseudomonas* CFC SELECTIVE SUPPLEMENT (cetrimide + cephalotin sodium salt + fucidina) reidratato con 4 mL di H_2O deionizzata sterile e 1 mL di etanolo 100%.

La concentrazione batterica è stata calcolata mediante la seguente formula:

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

in cui:

- il volume dell'inoculo è pari a 100 µL (0,1 mL);
- il numero delle piastre della diluizione 1 e della diluizone 2 è pari a 1;
- la diluizione 1 rappresenta la concentrazione maggiore delle due diluizioni consecutive considerate.

I calcoli sono stati svolti mediante l'uso di Excel e i grafici sono stati generati tramite Google Colaboratory, un ambiente di calcolo basato su cloud fornito da Google (https://colab.research.google.com/).

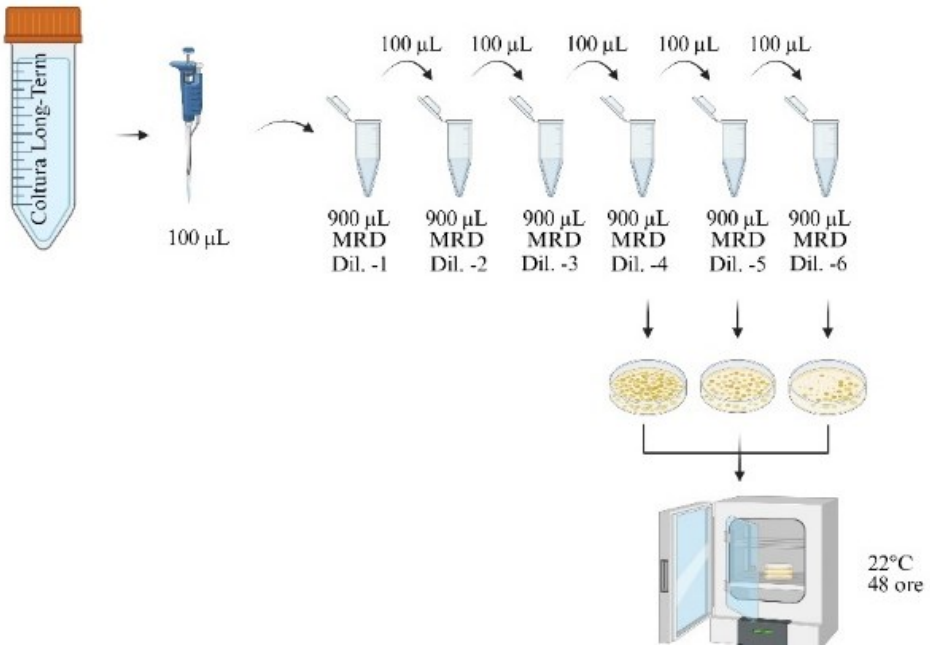

Figura 16: Conte batteriche su piastra (immagine realizzata con BioRender.com)

3.4.2. IDENTIFICAZIONE DEI *PERSISTERS*

È doveroso ricordare la distinzione tra resistenza e persistenza. La prima è una caratteristica genetica che permette al batterio di crescere e di moltiplicarsi attivamente in presenza dell'antibiotico, il secondo invece è uno stato fenotipico e transitorio. I batteri *persisters* sono una piccola sottopopolazione di cellule che entrano in uno stato di dormienza metabolica. Nonostante siano geneticamente identici alla popolazione sensibile, sopravvivono al trattamento antibiotico perché il loro metabolismo rallentato li rende "invisibili" al farmaco. Una volta rimosso l'antibiotico, possono "risvegliarsi" e generare una nuova popolazione che è nuovamente sensibile all'antibiotico. Per l'identificazione dei *persisters* si utilizza l'antibiotico kanamicina, è un antibiotico aminoglicoside e il suo meccanismo d'azione è ideale per isolare i persister in quanto

uccide attivamente le cellule batteriche, inibisce la sintesi proteica legandosi alla subunità ribosomiale 30S e l'ingresso della kanamicina nella cellula batterica è un processo attivo che dipende dal potenziale di membrana, il quale è generato da un metabolismo attivo. Di conseguenza, i batteri *persisters*, essendo in uno stato di dormienza con un metabolismo quasi nullo, non importano attivamente la kanamicina al loro interno e quindi sopravvivono, pur non avendo alcuna resistenza genetica.

La sensibilità dei ceppi alla kanamicina è differente, infatti la concentrazione utilizzata è di 30µg/µL per CECT 378 e di 6,25 µg/µL per L3_4 (ps_20) e uk1 (ps_77). Il protocollo utilizzato prevedeva:

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

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

Il primo vede:

- scegliere 10 colonie che andranno inserite in una piastra da 96 pozzetti, in particolare verranno poste secondo lo schema rappresentato in Figura 17 con PBS e con PBS + antibiotico;
- prelevare poi da ogni pozzetto 3 µl e rilasciarli sulla piastra precedentemente suddivisa come si può vedere nello schema dell'esperimento (Figura 18);
- in seguito ad incubazione (4 °C per 7 giorni o 22 °C overnight) si valuta la crescita: le colonie che crescono solo nel controllo sono persistenti mentre quelle che crescono in entrambi gli spot sono resistenti.

Il secondo procedimento prevede il lavaggio della piastra da cui prima sono state prelevate le colonie con 2 µL di PBS. Successivamente si divide il volume ottenuto in 3 parti:

- 300 µL vengono mischiati con qualche goccia di glicerolo e conservati a -80 °C;
- 300 µL vengono addizionati 300 µL di PBS e tenuti come controllo;
- 300 µL a cui vengono aggiunti 300 µL di antibiotico.

Il secondo e il terzo campione, rispettivamente controllo e quello con aggiunta di antibiotico, si piastrano in piastra PAB/CFC. Se le colonie appaiono in seguito al trattamento sono resistenti se invece sono presenti solo sul controllo sono persistenti.

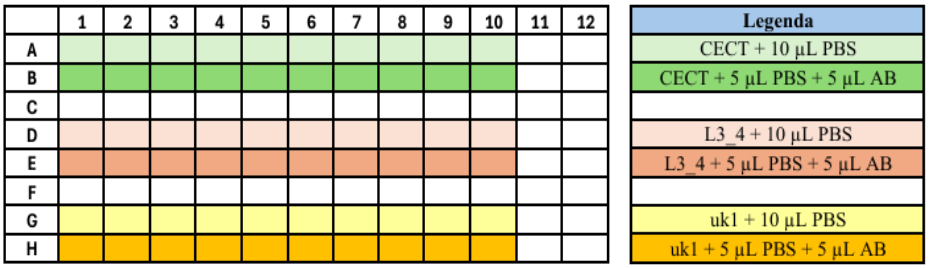

Figura 17: Schema utilizzato durante il protocollo di trattamento con antibiotico con relativa legenda

3.4.2.1. QUANTIFICAZIONE DEI *PERSISTERS*

La concentrazione dei possibili *persisters* è stata calcolata con la formula descritta nel capitolo 3.4.1. Invece la concentrazione di *persisters* veri e propri è stata ottenuta utilizzando i dati ricavati dalle piastre seminate con le 10 colonie (primo procedimento). In base al numero di colonie cresciute si è ricavata la % di *persisters* che è poi stata moltiplicata per la potenza dei possibili *persisters*.

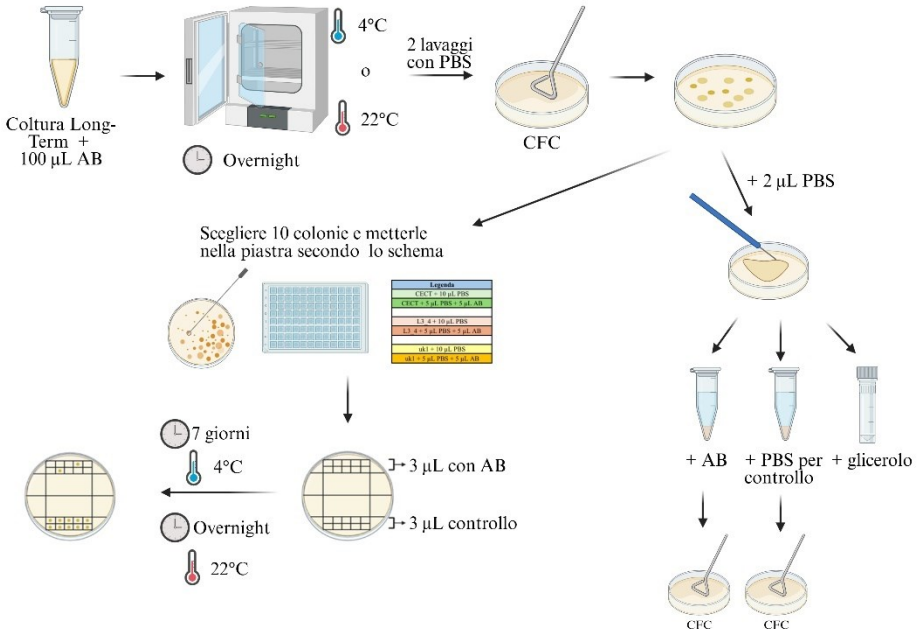

Figura 18: Schema protocollo di identificazione persisters con kanamicina (immagine realizzata con BioRender.com)

3.4.3. IDENTIFICAZIONE DEI VBNC

Lo stato VBNC è una condizione di sopravvivenza in cui alcuni batteri entrano in risposta a stress ambientali come ad esempio mancanza di nutrienti, temperature estreme, presenza di disinfettanti. In questo stato, le cellule sono vitali, in quanto mantengono l'integrità della membrana cellulare e un'attività metabolica minima, ma non coltivabili perché non sono in grado di crescere e formare colonie sui terreni di coltura standard da laboratorio. Per superare i limiti della coltura, si usano metodi molecolari come la PCR quantitativa (qPCR), che rileva il DNA di un microrganismo. Tuttavia, la qPCR da sola non distingue tra cellule vive e morte, perché il DNA persiste nell'ambiente anche dopo la morte cellulare e proprio per questo viene abbinato al PMAxx.

3.4.3.1. USO DEL COLORANTE PMAxx

Il PMAxx™ (Propidium Monoazide xx) è una versione migliorata del colorante PMA. È un intercalante del DNA con due proprietà fondamentali:

- il PMAxx non può attraversare una membrana cellulare intatta e sana ma può entrare solo in cellule la cui membrana è danneggiata, come quelle morte;
- necessita di foto-attivazione in quanto il PMAxx contiene un gruppo "azide" che, quando esposto a una luce forte a una specifica lunghezza d'onda (solitamente luce blu) si lega in modo covalente e permanente al DNA.

Il meccanismo d'azione è il seguente: il PMAxx viene aggiunto a un campione contenente una popolazione mista di cellule vive, morte e VBNC. Il colorante penetra solo nelle cellule morte, in quelle con membrana compromessa e si lega al DNA libero (ingresso selettivo). Le cellule vive e le cellule VBNC, avendo una membrana intatta, lo escludono. Vi è poi una fase di foto-attivazione in cui il campione viene esposto a una fonte di luce intensa. All'interno delle cellule morte, il PMAxx si lega covalentemente al DNA. Questo legame covalente "maschera" il DNA delle cellule morte, impedendo alla DNA polimerasi di amplificarlo durante la successiva reazione di qPCR (Figura 19).

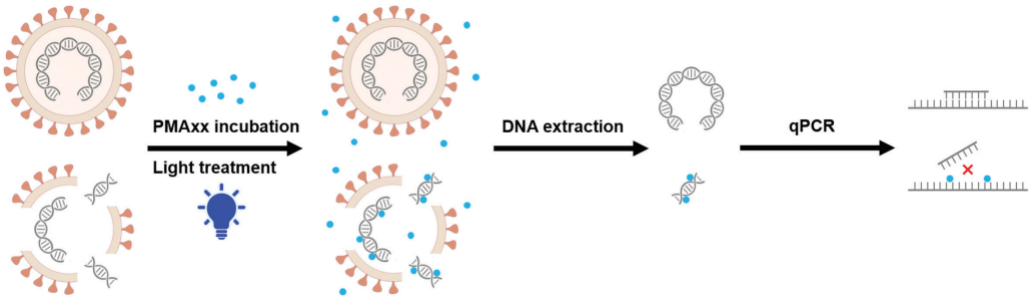

Figura 19: Rappresentazione funzionamento PMAxx (Li et al., 2024)

I passaggi che sono stati svolti in laboratorio sono i seguenti:

- aggiungere a 200 µL di coltura *Long-Term* 50 µL di *enhancer* 5X e 2,5 µL di PMAxx 2,5 nM;
- attendere 5 minuti di incubazione;
- mettere le eppendorf per 15 minuti in lampada *PMA-Lite LED Photolysis Device* (BIOTIUM) che permette al dye di fissarsi al DNA (intensifica il legame);
- conservare le eppendorf a -20°C.

3.4.3.2. ESTRAZIONE DNA PER BOLLITURA

Il DNA dei campioni è stato estratto in seguito mediante estrazione per bollitura. Il protocollo di estrazione del DNA per bollitura è spiegato di seguito (Figura 20):

- prendere i campioni dal congelatore a -20°C;
- fare 3 minuti di centrifuga a 12000 rpm;
- eliminare il surnatante;
- aggiungere 100 µL di H_2O nucleasi *free* e mischiare con vortex;
- mettere nel termoblocco a 95°C per 10 minuti;
- fare 2 minuti di centrifuga a 12000 rpm;
- mettere il surnatante in provette che verranno poi stoccate a -20°C;
- prelevare 2 µL di surnatante e addizionarle a 198 µL di H_2O nucleasi *free* (dil. 1:100);
- vortexare e mettere a -20°C.

Questo DNA diluito verrà poi utilizzato per la PCR Real-Time.

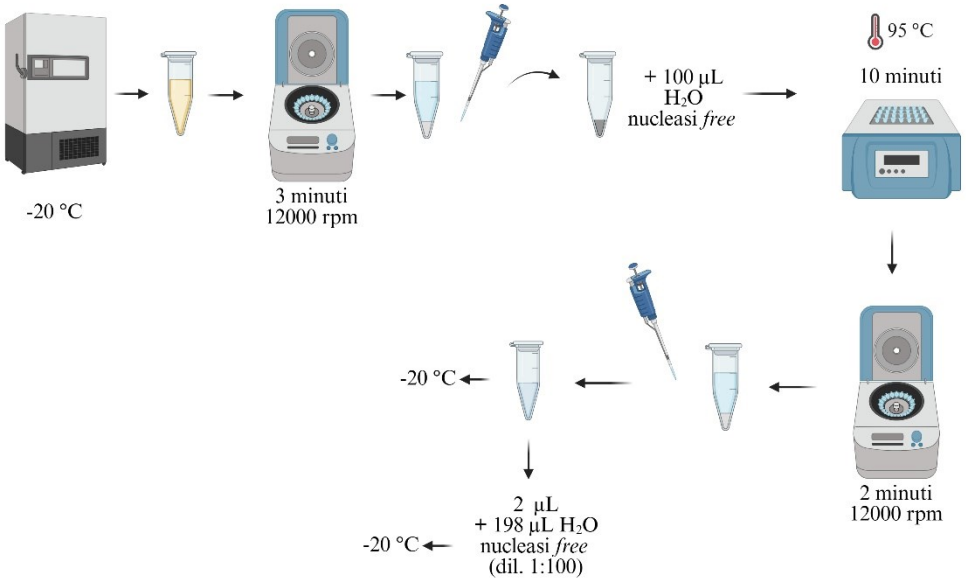

Figura 20: Estrazione DNA per bollitura (immagine realizzata con BioRender.com)

3.4.3.3. REAL-TIME PCR

Per valutare la dinamica di crescita della coltura batterica, è stata condotta un'analisi di Real-Time PCR utilizzando il sistema LightCycler® 480, Roche. Sono stati impiegati specifici *primer* progettati per il gene *rpoD* codificante la subunità principale della RNA polimerasi di *Pseudomonas fluorescens* (Andreani et al 2014), visibili nella Tabella 2.

Tabella 2: Primer utilizzati in Real-Time PCR

Primer utilizzati		
Primer Forward	2368 gene rpod_F_Pse_qPCR	AGCTCAACCGTATTTCCCG (19)
Primer Reverse	2369 gene rpod_R_Pse_qPCR	TTCGATGAAGTCACCCAGATG 21)

La PCR Real-Time permette di monitorare la produzione degli ampliconi in tempo reale (da qui il nome real-time) e per fare ciò, utilizza un intercalante del DNA, il SYBR *Green*, il quale è in grado di legarsi al DNA a doppio filamento; quando si trova in questa condizione, emette una fluorescenza di intensità maggiore rispetto a quando si trova libero nella soluzione e tale segnale fluorescente, viene misurato al termine di ogni ciclo di amplificazione. In questo modo, la fluorescenza è direttamente proporzionale al DNA presente. Per verificare inoltre, che tale fluorescenza sia specifica dell'amplicone di interesse e non sia dovuta ad aspecifici o a dimeri di primer, viene analizzata la curva di *melting*, la quale permette di ottenere la temperatura di *melting* (Tm) degli amplificati.

A 2,5 µL di DNA, che era stato diluito in precedenza 1:100, sono stati addizionati 7,5 µL di mix di reazione. Quest'ultima è stata preparata con la *Master mix PowerUp SYBR Green* (Applied Biosystems™). Al suo interno sono presenti:

- il SYBR *Green*, un fluoroforo che è in grado di intercalarsi in modo aspecifico nel DNA, permettendo di valutare la presenza di DNA a doppio elica amplificato dalla reazione;
- dNTPs;
- enzima Taq polimerasi;
- soluzione tampone di reazione;
- ioni $MgCl_2$.

I volumi che sono stati utilizzati per ciascun campione sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3: Componenti usati nella preparazione della Mix per la reazione di Real-time PCR per singolo campione

Mix di reazione	Volume 1X
PowerUp SYBR Green Master Mix	5 µl
Primer forward (10 µM)	0,25 µl
Primer reverse (10 µM)	0,25 µl
DNA	2,5 µl
Acqua	2 µl

Si è proceduto con il caricamento della piastra da 96 pozzetti in cui in ciascun pozzetto sono stati inoculati 7,5 µl di Mix e 2,5 µl di DNA. Sono stati inclusi anche un controllo negativo (acqua) e un controllo positivo (DNA di *P. fluorescens*). La piastra è stata posta nel termociclatore

(*LightCycler*® 480, Roche) che ha compiuto 45 cicli di reazione secondo tempistiche e temperature precise definite dal protocollo applicato (Tabella 4). È stato utilizzato il sistema UNG che serve per evitare contaminazioni da prodotti di PCR precedenti. Infatti, a termine amplificazione la quantità di amplicone che si ottiene è molto elevato e una minima quantità potrebbe contaminare reagenti ed ambiente causando poi contaminazioni nelle seguenti mix di reazione, preparate nello stesso ambiente o con le stesse provette o dagli stessi operatori. Il sistema UNG prevede che nella master mix il desossinucleotide con la Timina (dTTP) venga sostituito con quello con Uracile (dUTP) che non è normalmente presente nelle molecole di DNA e prevede inoltre la presenza dell'enzima UNG (uracile DNA glicosilasi) che è in grado di degradare il nucleotide contente uracile dalla doppia elica. Questo sistema consente l'eliminazione dei contaminanti senza alcun impatto sul DNA bersaglio contente timina. L'enzima UNG viene poi inattivato con un riscaldamento a 95°C per pochi minuti. Quindi i 2 minuti a 50° C all'inizio della reazione di amplificazione permettono l'azione della UNG sulle eventuali doppie eliche contenenti U che derivano da precedenti amplificazioni. Il riscaldamento successivo a 95°C ha la funzione di attivare la Taq polimerasi e di inattivare completamente la UNG permettendo la neosintesi di doppie eliche contenenti U. Seguono i 45 cicli che includono le tre fasi chiave della reazione, ossia la fase di denaturazione che avviene a 95°C (10 secondi) e le fasi di *annealing* ed estensione che avvengono a 60°C (40 secondi). Infine, viene impostato un ultimo ciclo in cui la temperatura è portata lentamente fino a 95°C al fine di ottenere la creazione delle *curve di melting*.

Tabella 4: Protocollo termico per PCR Real-Time

Protocollo con tempi e temperature real time PCR			
Step	Temperatura	Tempo	
Sistema UDG	50 °C	2 minuti	
Denaturazione iniziale	95 °C	2 minuti	
Denaturazione	95 °C	10 secondi	45 cicli
Annealing ed estensione	60 °C	40 secondi	
Creazione curva di *melting*	95 °C	5 secondi	
	60 °C	1 minuto	
	95 °C	0,11 °C/s	
Raffreddamento	40 °C	30 secondi	
Mantenimento	4 °C	-	

3.4.3.4. QUANTIFICAZIONE DEI CAMPIONI MEDIANTE CURVE STANDARD

Oltre a rilevare la presenza dei batteri all'interno di un campione, la PCR *Real-Time* può essere utilizzata anche per quantificare tali microrganismi. Per fare ciò, è stata utilizzata una curva

standard costruita in precedenza utilizzando dei campioni a concentrazione nota per ciascuno dei 3 ceppi. La curva standard è stata costruita nel seguente modo: il DNA di un campione è stato quantificato al Qubit e poi sono state fatte diluizioni seriali 1:2, il valore di DNA di ogni diluizione espresso in ng è stata moltiplicata per 2,5 (pari al volume messo nel pozzetto) e il risultato ottenuto è stato poi diviso per il peso di una copia di genoma di *Pseudomonas* (pari a 6,5736 x 10^{-6} ng). È stata ricavata l'equazione della retta da utilizzare successivamente per ricavare la concentrazione dei campioni in esame, in cui la *x* rappresenta il log delle copie di genoma e la *y* i Cp. In particolare, i Cp ottenuti per i campioni incogniti sono stati inseriti nell'equazione della retta degli standard per poter derivare il numero di copie di genoma (log), contenuto nel volume usato nella reazione (2,5 µl). È stata quindi calcolata la quantità di molecole contenute in 1 ml, tenendo conto anche della diluizione effettuata in fase di estrazione, pari a 1:100. Sapendo che una cellula batterica contiene una singola copia genomica, si è potuto convertire il valore riferito al numero di copie/ml in una misura del numero di cellule/ml. Il passaggio finale è stato quello di confrontare i dati della PMAxx-qPCR con quelli della conta su piastra. Facendo la differenza tra il valore log cellule/ml ottenuto con la PMAxx-qPCR (cellule vi tali) e il valore ottenuto con le conte (cellule vitali e coltivabili) è stata ricavata la frazione di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) contenute nelle colture in esame.

3.4.4. MOTILITÀ

I test di motilità batterica sono procedure microbiologiche utilizzate per determinare se un batterio è in grado di muoversi autonomamente, di solito tramite l'uso di appendici chiamate flagelli. La motilità batterica viene determinata inoculando i microrganismi in un terreno semisolido. La consistenza gelatinosa del mezzo permette ai batteri dotati di motilità di diffondersi. Di conseguenza, i ceppi in grado di muoversi formeranno un'area di crescita diffusa e torbida che si espande radialmente dal punto di inoculo, un fenomeno osservabile a occhio nudo dopo l'incubazione, mentre quelli immobili restano confinati alla zona iniziale. La motilità dei ceppi batterici in esame è stata valutata mediante un saggio di diffusione in un terreno semisolido, o *soft agar*. È stato scelto il terreno TSA (*Tryptic Soy Agar*), preparato con due diverse concentrazioni di agar. Il TSA 0,3% è stato utilizzato per studiare la capacità delle cellule batteriche di muoversi mediante *swimming*, mentre il TSA 0,6% per studiare la capacità di fare *swarming*. Con lo *swimming* la cellula utilizza i suoi flagelli per spingersi attraverso il liquido, è un meccanismo che permette al batterio di esplorare l'ambiente e muoversi verso zone con più nutrienti. Lo *swarming*, invece, viene innescato solo ad alta densità cellulare. I batteri producono un numero maggiore di nuovi flagelli (iperflagellazione) e si muovono insieme come "sciami", spesso secernendo surfattanti per ridurre l'attrito con la superficie e facilitare lo spostamento. In breve, lo *swimming* interessa singole cellule che si muovono in un mezzo liquido, mentre lo *swarming* è un comportamento collettivo che si verifica su un substrato solido, sebbene sia necessaria anche in

questo caso la presenza di un sottile strato di liquido sulla superficie. I due terreni sono stati seminati in modo diverso:

- *Swimming*. 3 µL di coltura sono stati seminati al centro della piastra contenente il TSA 0,3% e immergendo leggermente il puntale nell'agar. Sono state allestite tre repliche tecniche (A, B, C con tre piastre Petri) per ogni coltura per un totale di 45 piastre (Figura 21);
- *Swarming*: le piastre di Petri contenti TSA 0.6% sono state divise in 3 sezioni e 3 µL di coltura sono stati seminati rilasciando una goccia di coltura sulla superficie della piastra. Sono state seminate nella stessa piastra le 3 repliche di ogni tubo (A, B, C), ottenendo così in totale 15 piastre (Figura 22)

In seguito alla semina le piastre sono state poste ad incubare: per 24 ore a 22° C per l'esperimento a 22 °C e per 7 giorni a 4 °C per l'esperimento a 4 °C. Successivamente sono state fotografate usando un sistema di cattura dell'immagine in camera oscura, realizzato appositamente seguendo le istruzioni fornite da Rodrigues et al. (2022).

In un secondo momento, è stata effettuata un'analisi di immagine usando il software *ImageJ* (ImageJ bundled with 64-bit Java 8). Più in dettaglio, è stato utilizzato il comando *Analyze* > *ROI Manager* > *Add* > *Measure* che consente di calcolare l'area di una selezione definita dall'utente all'interno di un'immagine. Nel nostro caso, l'obiettivo era quello di misurare la dimensione della zona di diffusione visibile attorno al punto di inoculo in TSA, per cui mediante l'uso di una tavoletta grafica è stata tracciata una linea lungo il perimetro della regione di interesse e ne è stata ricavata l'area, espressa in scala di pixels. Abbiamo normalizzato tutte le foto impostando il diametro della piastra come 8,5 cm (misurato in laboratorio). Per farlo: cliccare sul simbolo della linea > tracciare una linea che rappresenta il diametro della piastra > *Analyze* > *Set scale* > *Known distance* 8,5 cm > selezionare global.

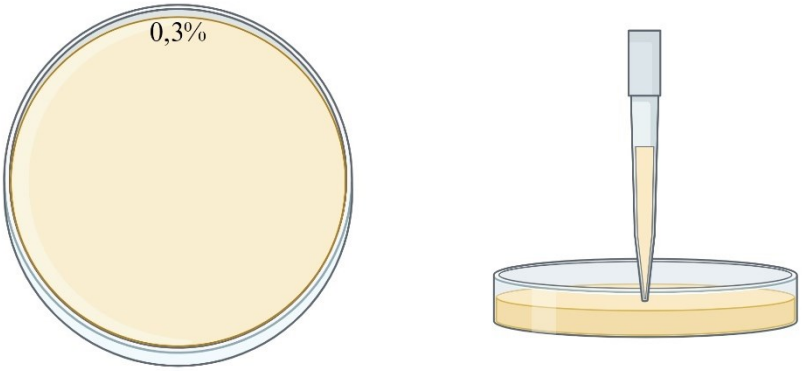

Figura 21: Rappresentazione piastra con TSA 0,3% per swimming (immagine realizzata con BioRender.com)

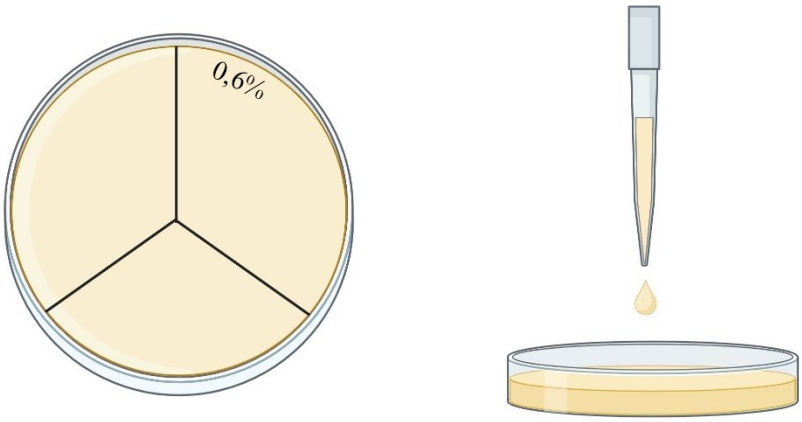

Figura 22: Rappresentazione piastra con TSA 0,6% per swarming (immagine realizzata con BioRender.com)

3.4.5. SEQUENZIAMENTO COLONIE PER VALUTARE LE MUTAZIONI

Lo scopo di questa fase del lavoro è stato quello di analizzare il genotipo delle colonie isolate per identificare le mutazioni accumulate durante la permanenza in coltura. Stabilire una solida connessione genotipo-fenotipo è fondamentale per comprendere i percorsi di adattamento batterico. Le colture che erano state congelate a -80 °C nei vari punti temporali di prelievo (come riportato in Figura 14, 30-180-365-730 giorni) sono state rivitalizzate mediante diluizioni seriali in MRD e piastramento su terreno CFC. In seguito, le piastre sono state poste ad incubare a 22 °C per 48 ore (Figura 23).

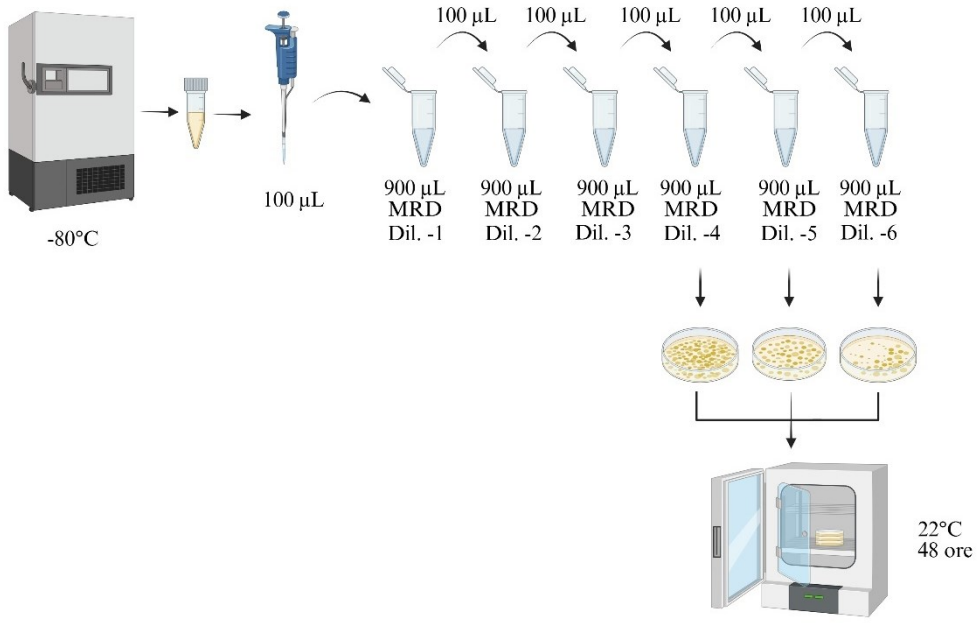

Figura 23: Piastramento campioni per estrazione DNA da sequenziare (immagine realizzata con BioRender.com)

3.4.5.1. ESTRAZIONE DNA DA COLONIE

In seguito all'incubazione sono state selezionate cinque colonie per ciascun campione dalle quali è stato estratto il DNA utilizzando il kit *Nextera™ DNA Flex Microbial Colony Extraction*. Questo kit impiega biglie di vetro per omogeneizzare il campione e successivamente biglie magnetiche per purificare il DNA, secondo i seguenti passaggi: mediante un'ansa si è prelevata la colonia dalla piastra di coltura batterica. Le singole colonie sono state risospese in provette *PowerBead* contenenti biglie di vetro (Biospec Products – Soda-lime glass beads 0,5 mm) e 300 µL di acqua nucleasi *free*. I campioni sono stati vortexati per cinque minuti alla velocità 8 con un Vortex-Genie 2 dotato di un adattatore apposito, e successivamente centrifugati a 20.000 × g per due minuti. Questo passaggio serve a omogeneizzare il campione. In una nuova provetta mettere 50 µL del surnatante, evitando di aspirare le biglie di vetro, e 20 µL di *SPRIselect Beads* (*Beckman Coulter*), cioè biglie magnetiche. La miscela è stata omogeneizzata pipettando e incubata a temperatura ambiente per cinque minuti. Questo passaggio serve a legare il DNA alle biglie magnetiche. Per rimuovere eventuali contaminanti senza perdere il DNA, le provette sono state poste su un supporto magnetico fino a quando le biglie non sono migrate completamente a lato della provetta (~5 minuti). Il surnatante è stato quindi rimosso senza disturbare il pellet di biglie. Infine, il pellet è stato lavato due volte aggiungendo 200 µL di etanolo all'80% a ciascuna provetta, incubando sul supporto magnetico per 30 secondi e poi scartando il surnatante. L'etanolo residuo è stato completamente rimosso e le provette sono state lasciate asciugare all'aria sul supporto magnetico per cinque minuti. Le provette sono state rimosse dal supporto magnetico e le biglie sono state risospese in 32,5 µL di 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 miscelando con la pipetta. Dopo un'incubazione di 2 minuti a temperatura ambiente, le provette sono state riposizionate sul supporto magnetico,

attendendo che il liquido diventasse limpido (~2 minuti). Questo passaggio serve a staccare (eluire) il DNA dalle biglie magnetiche. Infine, 30 µL del campione di DNA eluito sono stati posti in una nuova provetta e sono stati conservati in freezer a -20 °C (Figura 24).

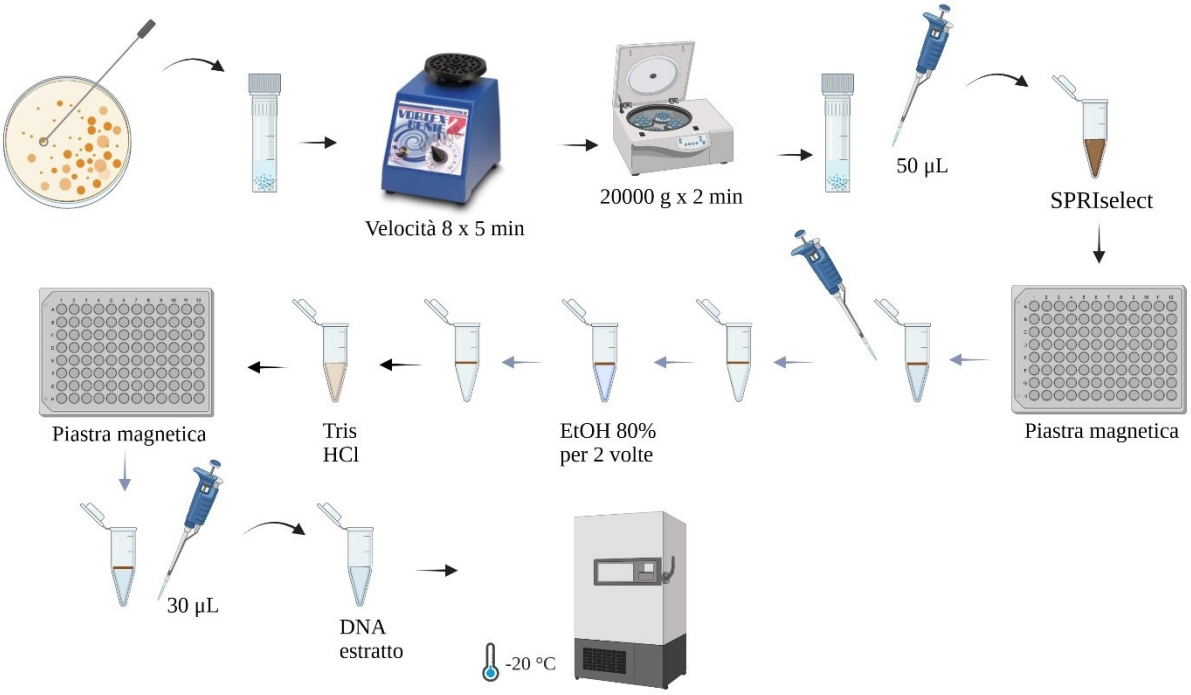

Figura 24: Estrazione DNA da utilizzare per fare le librerie (immagine realizzata con BioRender.com

3.4.5.2. QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO

Il DNA estratto è stato quantificato con il fluorimetro *Qubit* (*Invitrogen*). Questo strumento utilizza un fluorocromo che si lega specificamente al DNA e confronta la fluorescenza del campione con una curva standard lineare per determinarne la concentrazione. Questo strumento verrà meglio descritto nel paragrafo 3.4.5.4. di Materiali e metodi.

3.4.5.3. PREPARAZIONE LIBRERIE

Le librerie sono state preparate a partire dal DNA estratto (come spiegato nel paragrafo 3.4.5.1.), seguendo il protocollo della *Guida di Riferimento Illumina DNA Prep* per le fasi di tagmentazione, amplificazione e purificazione (*cleanup*) (Figura 25).

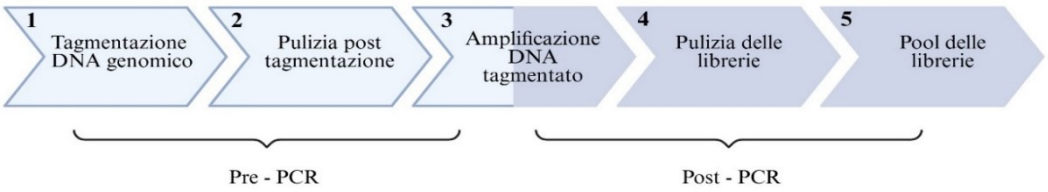

Figura 25: Workflow preparazione librerie (immagine realizzata con

1. La fase di tagmentazione (Figura 26) impiega Trasposomi Legati a Biglie (*Bead-Linked Transposomes*, BLT) per frammentare il DNA e simultaneamente legarvi gli adattatori, secondo i seguenti passaggi:

   - in ciascun tubino della strip sono stati aggiunti 15 µL di DNA e H_20 DNase free fino a raggiungere una quantità totale in ingresso (*input*) di 1-5 ng (i calcoli sono stati fatti basandosi sulle concentrazioni ottenute con il Qubit);

   - il buffer BLT è stato vortexato energicamente per essere risospesi e 5,5 µL di essi sono stati aggiunti a 5,5 µL di TB1 (Tagment Buffer 1) ottenendo così la *Master Mix* di tagmentazione (moltiplicando ogni volume per il numero di campioni da processare). La miscela è stata quindi vortexata per risospenderla e suddivisa in aliquote uguali in strip da 8 provette;

   - 10 µL di *Master Mix* di tagmentazione sono stati trasferiti dalla strip da 8 provette a ciascun pozzetto della piastra contenente i campioni, i quali sono stati risospesi pipettando 10 volte;

   - i tubini della strip sono stati inseriti nel termociclatore pre-programmato ed è stato avviato il programma a 55°C per 15 minuti (con mantenimento a 10°C).

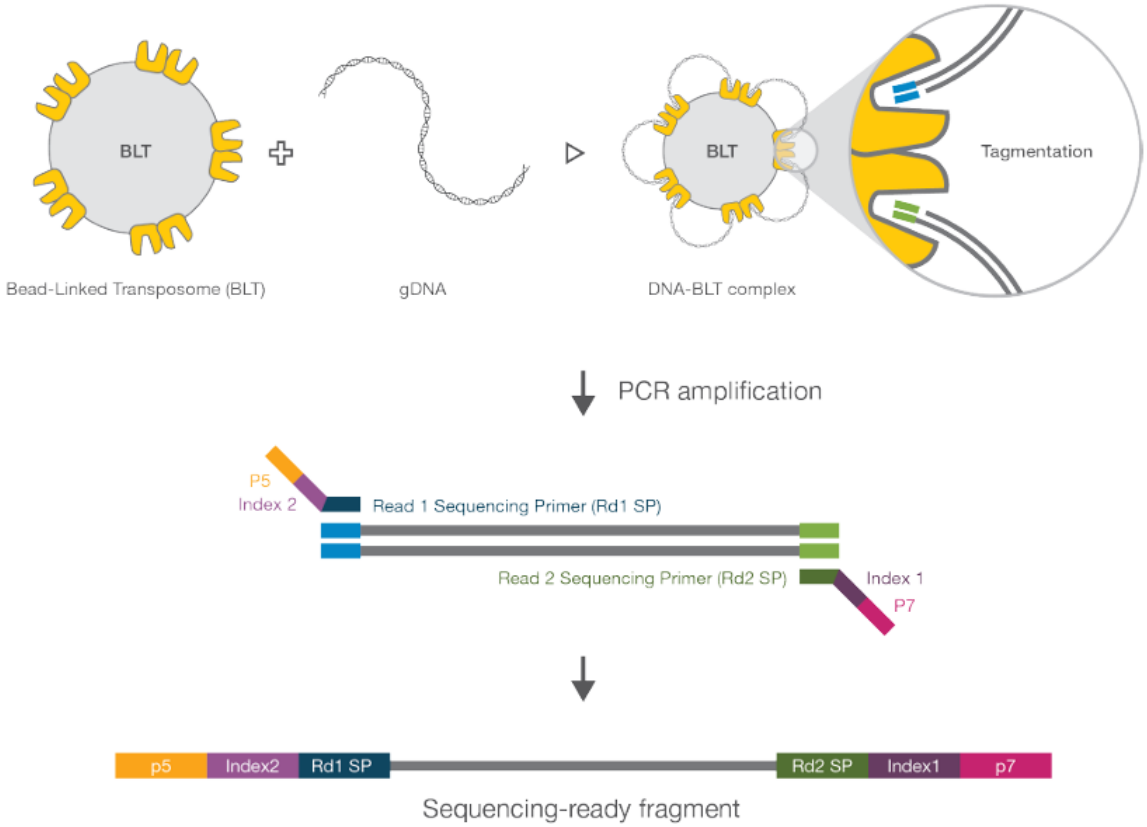

Figura 26: Per la preparazione di librerie Illumina si impiega un complesso trasposomico legato a biglie per effettuare la tagmentazione del DNA genomico, un processo che in un unico passaggio frammenta il DNA e vi lega sequenze adattatrici. Successivamente alla tagmentazione, la fase di PCR aggiunge due index adapters e le sequenze necessarie per la generazione dei cluster di sequenziamento (da Guida di Riferimento Illumina DNA Prep).

2. Durante la fase di post-tagmentazione, il DNA legato agli adattatori sui BLT viene lavato prima dell'amplificazione tramite PCR, secondo i seguenti passaggi:

   - sono stati aggiunti 5 µL di *Tagment Stop Buffer* e le biglie sono state quindi risospese pipettando lentamente per 10 volte;

   - è stato avviato un programma sul termociclatore pre-programmato a 37°C per 15 minuti (con mantenimento a 10°C);

   - dopo aver posizionato la piastra sul supporto magnetico e aver atteso che il liquido diventasse limpido (~3 minuti), il surnatante è stato rimosso e scartato utilizzando una pipetta multicanale;

   - sono stati eseguiti due lavaggi come segue: aggiungendo 50 µL di TWB (*Tagment Wash Buffer*) direttamente sulle biglie, pipettando lentamente (per evitare la formazione di schiuma) fino alla completa risospensione delle biglie, posizionando la piastra sul supporto magnetico fino a quando il liquido non è diventato limpido (~3 minuti) e infine rimuovendo il surnatante. Dopo aver ripetuto questo passaggio una seconda volta, la piastra è stata mantenuta sul supporto magnetico fino al passaggio 4 della sezione "Amplificazione del DNA tagmentato".

     Il TWB viene lasciato nei pozzetti per evitare che le biglie si secchino eccessivamente.

3. Il DNA tagmentato è stato amplificato utilizzando un programma di PCR a cicli limitati. La fase di PCR, che aggiunge due adattatori indice (*index adapters*) e le sequenze necessarie per la generazione dei *cluster* di sequenziamento, è stata eseguita come segue:

   - è stata preparata la *Master Mix* per la PCR aggiungendo (ogni volume moltiplicato per il numero di campioni) 11 µL di EPM (*Enhanced PCR Mix*) e 11 µL di acqua nucleasi *free*. La miscela è stata quindi vortexata e centrifugata a 280 × g per 10 secondi;

   - dopo aver posizionato i campioni sul supporto magnetico, il surnatante è stato scartato;

   - rimuovendo la piastra dal supporto magnetico, sono stati aggiunti 20 µl di *Master Mix* per la PCR direttamente sulle biglie in ciascun pozzetto. I campioni sono stati omogeneizzati pipettando fino a completa risospensione, quindi centrifugati a 280 × g per 3 secondi;

   - infine, gli adattatori index sono stati aggiunti a ciascun campione e miscelati pipettando. È stata poi eseguita una centrifugata a 280 × g per 30 secondi;

   - è stato avviato il seguente programma sul termociclatore pre-programmato: 68°C per 3 min, 98°C per 3 min, 12 cicli (98°C per 45 sec, 62°C per 30 sec, 68°C per 2 min), 68°C per 1 min (con mantenimento a 10°C).

4. La fase di pulizia delle librerie impiega una procedura di purificazione con biglie a doppia selezione (*double-sided bead purification*) per purificare le librerie amplificate. Si procede in questo modo:
   - centrifugare a 280 × g per 1 minuto per raccogliere il contenuto sul fondo del pozzetto;
   - posizionare la piastra sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi limpido (~5 minuti);
   - trasferire 22,5 µL di surnatante da ciascun pozzetto della piastra PCR al pozzetto corrispondente di una nuova piastra;
   - vortexare e invertire più volte la provetta di IPB (*Illumina Purification Beads*) per risospendere le biglie;
   - aggiungere 22,5 µL di IPB a ciascun pozzetto contenente il surnatante e 20 µL di acqua nucleasi *free*;
   - miscelare pipettando 10 volte in ciascun pozzetto e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti;
   - posizionare sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi limpido (~5 minuti);
   - durante l'incubazione, vortexare accuratamente la provetta stock di IPB (non diluito) e poi aggiungere 7,5 µL a ciascun pozzetto di una nuova piastra e 62,5 µL di surnatante e miscelare pipettando 10 volte;
   - incubare la piastra sigillata a temperatura ambiente per 5 minuti;
   - posizionare sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi limpido (~5 minuti);
   - senza disturbare le biglie, rimuovere e scartare il surnatante;
   - eseguire due lavaggi come segue: mantenendo la piastra sul supporto magnetico, aggiungere 180 µL di etanolo all'80% (EtOH) preparato di fresco, senza miscelare, incubare per 30 secondi e, senza disturbare le biglie, rimuovere e scartare il surnatante;
   - utilizzare una pipetta da 20 µl per rimuovere e scartare l'etanolo residuo;
   - lasciare asciugare all'aria sul supporto magnetico per 5 minuti;
   - rimuovere la piastra dal supporto magnetico e aggiungere 20 µL di RSB (*Re-Suspension Buffer*) alle biglie. Risospendere pipettando;
   - incubare a temperatura ambiente per 2 minuti;
   - posizionare la piastra sul supporto magnetico e attendere che il liquido sia limpido (~2 minuti);
   - trasferire 16 µL di surnatante in una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.

Prima del *pooling*, il DNA delle librerie è stato quantificato con Qubit (Invitrogen) e la sua dimensione è stata verificata con il Bioanalyzer (Agilent). Quest'ultimo metodo si basa su una separazione su gel, in cui l'accuratezza è ottenuta normalizzando i risultati rispetto a marcatori interni e a un *ladder* esterno. Questo passaggio di controllo qualità (*quality check*) è importante

per assicurarsi che vi sia abbastanza DNA per l'analisi e che le librerie ottenute abbiano la dimensione e la quantità corrette prima di essere inviate al centro di sequenziamento.

5. Durante il *pooling*, tutti i campioni sono stati uniti in un'unica provetta Eppendorf, come verrà spiegato in seguito.

3.4.5.4. ANALISI QUANTITATIVA DELLE LIBRERIE

Come menzionato in precedenza, il fluorimetro Qubit (Invitrogen) è stato utilizzato per quantificare il DNA in due momenti chiave: dopo l'estrazione, per assicurarsi che la quantità ottenuta fosse sufficiente prima di procedere, e prima della miscelazione delle librerie (*pooling*), per garantire che ogni campione fosse rappresentato in egual misura. L'equimolarità è di particolare importanza durante il sequenziamento per evitare la sovra rappresentazione di un campione; l'obiettivo, infatti, è ottenere un numero di *read* approssimativamente uguale per ciascun campione.

Per la misurazione, sono stati analizzati 2 µL di ogni campione, utilizzando il *Qubit Assay Kit HS* (*High Sensitivity*) e seguendo questo protocollo:

- è stata preparata la soluzione di lavoro (una miscela contenente il fluoroforo e il buffer HS in rapporto 1:200), unendo 199 µL di buffer HS e 1 µL di fluoroforo per ogni campione da analizzare, più i due standard;
- due provette per il saggio sono state riempite con 190 µL di soluzione di lavoro e 10 µL di Standard 1 e Standard 2, rispettivamente. Gli standard sono necessari per calibrare lo strumento prima della misurazione;
- i campioni da analizzare sono stati preparati aggiungendo 198 µL di soluzione di lavoro a 2 µL di campione. Il fluoroforo presente nella soluzione si lega selettivamente al DNA.

La procedura di misurazione prevede la lettura iniziale dei due standard per generare una curva di calibrazione lineare. Le misure di fluorescenza dei campioni vengono quindi confrontate con questa curva per ottenere la loro concentrazione finale. Se i campioni risultano *Out Of Range* significa che la loro concentrazione è maggiore dello Standard 2 (a concentrazione maggiore) e bisogna quindi procedere con la diluizione (2 µL DNA + 98 µL acqua deionizzata) e poi successiva rilettura allo strumento.

3.4.5.5. ANALISI QUALITATIVA DELLE LIBRERIE

Per l'analisi qualitativa della libreria è stato utilizzato il 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), il quale è un dispositivo che permette di eseguire un'elettroforesi microcapillare, più precisa rispetto a quella ottenuta tramite il gel d'agarosio. Il principio alla base dei due metodi però è lo stesso: anche nel Bioanalyzer i campioni vengono separati in base al peso molecolare, grazie al

movimento del DNA all'interno di una matrice. Nel nostro caso è stato utilizzato il *chip* "*High sensitivity DNA Chip*" (Figura 26). Il metodo è particolarmente vantaggioso perché, oltre a essere molto sensibile, richiede una quantità di campione estremamente ridotta. Il chip è costituito da 4 righe e 4 colonne per un totale di 16 pozzetti; di questi però, solo 11 sono destinati ai campioni in quanto gli altri sono destinati all'inserimento del *Gel-Dye Mix*, del *ladder* e del *marker*. I pozzetti sono collegati da dei microcapillari di vetro in cui si trova il *Gel-Dye Mix*. Per eseguire la corsa devono essere inseriti il *marker*, che permette di controllare e delimitare la corsa, e il *ladder*, un marcatore di peso molecolare e permette di identificare la lunghezza dei frammenti presenti nei campioni. Il software 2100 Expert fornisce come output un elettroferogramma nel quale viene rappresentata la fluorescenza rilevata in funzione del tempo di migrazione e un'immagine con le tipiche bande di un gel d'agarosio. Durante tutti i passaggi è necessario fare attenzione alla luce ed è quindi opportuno utilizzare dell'alluminio per coprire tutti i reagenti e anche il chip, poiché i coloranti presenti nel *Gel-Dye Mix*, nel *marker* e nel *ladder* sono sensibili alla luce. Si procede preparando il *Gel-Dye Mix* e 9 µL di quest'ultimo vengono aggiunti nel pozzetto contrassegnato dal simbolo G con sfondo nero (Figura 27). Viene poi operata una pressione, grazie all'utilizzo di una siringa, la quale viene spinta per un minuto e questo permette al *Gel-Dye Mix* di distribuirsi lungo i microcapillari. Vengono poi inseriti altri 9 µL di *Gel-Dye Mix* nei pozzetti contrassegnati dalla lettera G, 5 µL del *marker* in tutti i pozzetti destinati ai campioni e anche nel pozzetto in cui verrà inserito il *ladder*, contrassegnato dal simbolo della scala. Successivamente viene inserito 1 µL del campione nei diversi pozzetti e 1 µL di *ladder* nel pozzetto apposito. Il chip viene poi sottoposto ad agitazione mediante l'utilizzo del vortex per 1 minuto e inserito nell'apposito strumento per condurre l'analisi. Le librerie di buona qualità presentano una lunghezza compresa tra 250 e 1000 bp.

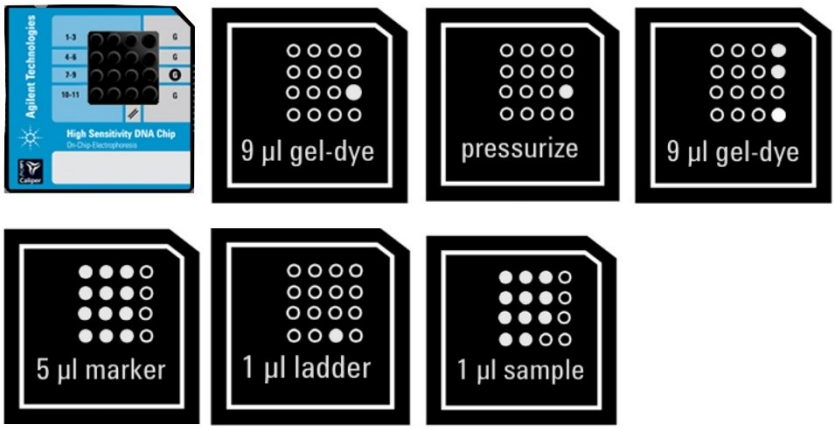

Figura 27: Chip Bioanalyzer ed ordine di caricamento reagenti

3.4.5.6. POOLING DELLE LIBRERIE E SEQUENZIAMENTO

Durante il *pooling*, tutti i campioni sono stati uniti in un'unica provetta Eppendorf, ma la concentrazione di ciascuno è stata normalizzata in modo che tutti i campioni avessero la stessa quantità di DNA. La normalizzazione delle librerie è stata eseguita manualmente allo scopo di ottenere per ogni libreria una concentrazione equimolare. Le librerie sono state quantificate mediante il Qbit® e, tenendo conto della dimensione media dei frammenti di ciascuna libreria calcolata dal Bioanalyzer, sono state distribuite in maniera equimolare. Il pooling consiste nell'unificazione di volume uguale delle library normalizzate in un singolo tubo.

Infine, il pool finale è stato inviato al centro di sequenziamento Biomarker Technologies (BMKGENE) in cui è stato eseguito utilizzando una piattaforma Illumina Novaseq 6000 con una lunghezza di lettura (*read length*) di 150 bp in modalità *paired-end* (PE).

Il centro di sequenziamento ha poi restituito le sequenze *fastq* già demultiplexate.

3.4.6. ANALISI BIOINFORMATICA DEI DATI NGS

Le *reads* ottenute in seguito al sequenziamento eseguito presso il centro di sequenziamento sono state sottoposte al controllo di qualità e successivamente assemblate. I *file* dei *contig* in formato *.fasta* sono poi stati analizzati attraverso l'utilizzo di vari *software* e *tool online* bioinformatici.

Controllo qualità e trimming delle sequenze

I dati grezzi di sequenziamento sono stati sottoposti ad un controllo di qualità che è stato eseguito utilizzando il software **FastQC** (Andrews S., 2010), il quale permette di analizzare i file delle *read* in formato FASTQ. Il formato FASTQ è un formato di testo che include sia la sequenza nucleotidica che la qualità di ogni base (*score*) ed è costituito da quattro righe. La prima inizia con il carattere "@" e contiene l'identificativo della sequenza e una descrizione opzionale, la seconda contiene la sequenza nucleotidica, la terza inizia con il carattere "+" (più una ripetizione opzionale dell'identificatore e della descrizione), la quarta mostra simboli (caratteri ASCII) che indicano la qualità assegnata a ciascun nucleotide del secondo campo con il punteggio di qualità *Phred score* o semplicemente *Q-score*, utilizzato per calcolare la probabilità di errore di sequenziamento (P).
P= 10^(-Q/10), pertanto, ad esempio, se il *Q-score* è 10 (basso) la probabilità che una base "chiamata" in quella specifica posizione sia errata è di 1 su 10 (quindi l'accuratezza è del 90%), e se il *Q-score* è 40 (eccellente) la probabilità che una base "chiamata" in quella specifica posizione sia errata è di 1 su 10000 (l'accuratezza in questo caso è del 99,99%). Normalmente, un *Q-score* di 28 o più è considerato un buon punteggio di qualità, mentre uno inferiore a 20 è considerato di bassa qualità. L'output di FastQC è un file HTML che contiene informazioni di facile consultazione sulla qualità delle *read*, come mostrato in Figura 28.

Read in formato FASTQ

```
@HWI-ST330:304:H045HADXX:1:1101:1111:61397
CACTTGTAAGGGCAGGCCCCCTTCACCCTCCCGCTCCTGGGGGANNNNNNNNNNANNNCGAGGCCCTGGGGTAGAGGGNNNNNNNNNNNNNNGATCTTGG
+
@?@DDDDDDHHH?GH:?FCBGGB@C?DBEGIIIIAEF;FCGGI#########################################################
```

Report FastQC in file HTML

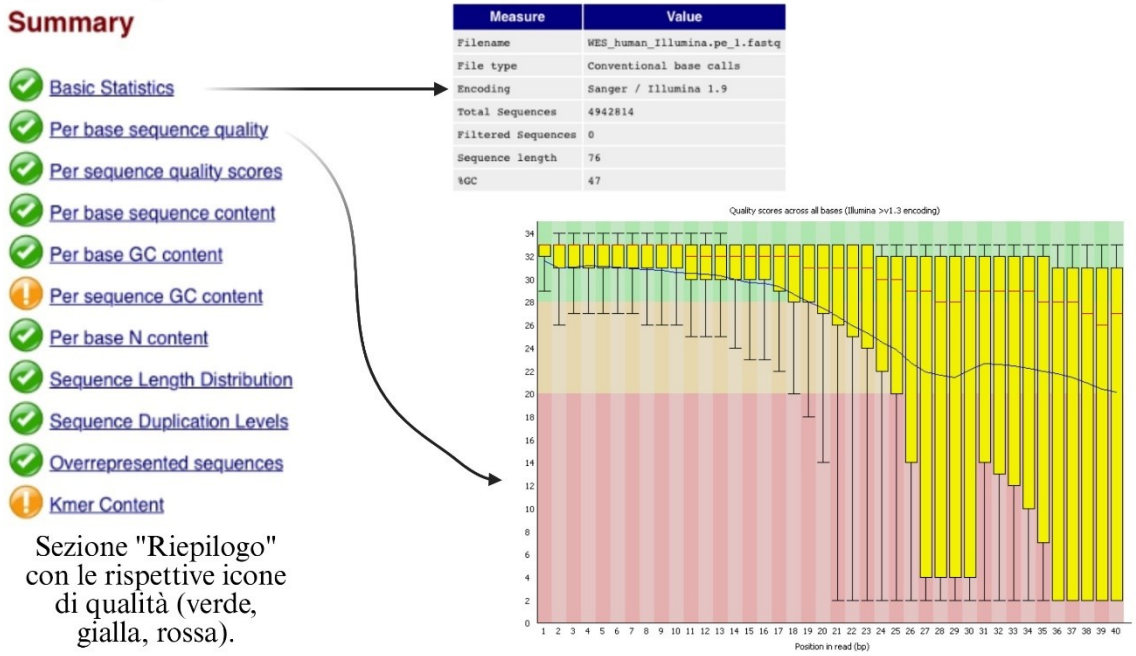

Figura 28: FastQC Report – esempio preso da https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Per rimuovere i dati di sequenza di bassa qualità e le sequenze tecniche (cioè le sequenze degli adattatori) - un processo noto anche come "*trimming*" - è stato impiegato il software **Cutadapt** versione 4.9 (Martin M., 2011), che permette di accorciare le *read* eliminando i nucleotidi con punteggi di qualità bassi (normalmente situati all'inizio della *read*) e gli adattatori utilizzati per il sequenziamento.

Assemblaggio

Le sequenze sono state quindi assemblate utilizzando il software **SPAdes** (Bankevich A. et al., 2012), un algoritmo migliorato per dataset di genomi batterici da singola cellula o multicellulari, che gestisce problemi come errori di sequenziamento, copertura non uniforme, *ecc*. Vengono identificate le sovrapposizioni delle *read* e generati i *contig*. Per questo lavoro sono stati ottenuti genomi *draft* con SPAdes.

La qualità dei risultati è verificata con **QUAST** (Gurevich A. et al., 2013), un software per valutare e confrontare gli assemblaggi genomici con o senza genomi di riferimento. Esso produce numerosi report, tabelle riassuntive e grafici. Le informazioni più importanti fornite nell'output sono il numero di *contig*, il *contig* più lungo, N50 (la lunghezza di sequenza del *contig* più corto al raggiungimento del 50% della lunghezza totale dell'assemblaggio), L50 (il più piccolo numero di

contig la cui somma delle lunghezze costituisce la metà della dimensione del genoma – Figura 29), il contenuto di GC (%, il numero totale di nucleotidi G e C nell'assemblaggio, diviso per la lunghezza totale dell'assemblaggio), il numero di *mismatch* ogni 100kb. QUAST non distingue tra errori di singolo nucleotide (dovuti a errori di lettura o di assemblaggio) e polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel genoma assemblato rispetto a quello di riferimento.

Figura 29: Sopra: L'N50 è la lunghezza di sequenza del contig più corto al raggiungimento del 50% della lunghezza totale dell'assemblaggio. Per esempio, qui i contig sono ordinati dal più lungo al più corto. La lunghezza totale dell'assemblaggio è 400 bp, la cui metà è 200 bp. La lunghezza del contig che permette di raggiungere il 50% dell'assemblaggio totale è l'N50.

Sotto: L'L50 è il numero più piccolo di contig la cui somma delle lunghezze costituisce la metà della dimensione del genoma. Per esempio, in questo caso è il rango del contig che fornisce la lunghezza N50. Immagini tratte da Elin Videvall, 2017, molecularecologist.com

Il comando utilizzato è stato (per i dettagli si veda la Legenda sottostante):

```
spades.py --careful --cov-cutoff auto -k auto -1 sample_1.fastq -2 sample_2.fastq -o spades
```

--careful: tenta di ridurre il numero di *mismatch* e di brevi *indel*. Questa opzione è raccomandata solo per l'assemblaggio di piccoli genomi.
--cov-cutoff auto: valore di soglia (cutoff) della copertura delle read. Se impostato su "auto", SPAdes calcola automaticamente la soglia di copertura utilizzando una strategia conservativa.
-k auto: l'uso da parte di SPAdes di lunghezze di k-mer iterative permette di sfruttare appieno il potenziale delle read lunghe *paired-end*. Un k-mer è una sottosequenza nucleotidica di lunghezza definita (k), pertanto tutti i possibili k-mer di una sequenza di DNA possono essere numerosi.

3.4.7. VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI

Le mutazioni sono state individuate utilizzando **breseq** (Deatherage D. E. e Barrick J. E., 2014), un software per l'analisi di dati di ri-sequenziamento a lettura corta (*short-read*) che li confronta con genomi già sequenziati. Breseq utilizza lo strumento **Bowtie2** (Langmead B. e Salzberg S. L., 2012) per mappare le *read* alla sequenza del genoma di riferimento. Infatti, sono stati utilizzati come riferimento i campioni del giorno zero.

Il comando utilizzato è stato (per i dettagli si veda la Legenda sottostante): `breseq -l 60 -j 8 -o output -r genomic.gbff final_pure_reads_1.fastq final_pure_reads_2.fastq`

-r: specifica il genoma di riferimento su cui le *read* vengono mappate.

Breseq permette l'identificazione di mutazioni puntiformi, inserzioni di maggiori dimensioni, delezioni e sostituzioni.

Il **Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center** (**BV-BRC**) (Olson R. D. et al., 2023) è un sistema informativo progettato per supportare la ricerca sulle malattie infettive di origine batterica e virale. Nato dall'unione di due centri di risorse bioinformatiche (BRC) di lunga data, PATRIC (il sistema batterico) e IRD/ViPR (i sistemi virali), questa piattaforma online integra i dati di sequenziamento con potenti strumenti di analisi. Per questo studio, il BV-BRC è stato utilizzato per trovare *Gene Symbol* da utilizzare in analisi di *Gene Ontology* (GO).

Per fare l'analisi filogenetica sono invece stati utilizzati i software PhyloPhlAn 3.0 e IQ-Tree2.

PhyloPhlAn 3.0 fornisce un metodo per un'accurata analisi filogenetica e tassonomica dei genomi microbici e può, se necessario, recuperare e integrare centinaia di migliaia di genomi da database pubblici, incorporando anche informazioni da decine di migliaia di metagenomi. PhyloPhlAn 3.0 utilizza automaticamente insiemi specie-specifici di proteine di base, identificate in modo stabile usando le famiglie di geni UniRef90, per costruire filogenie accurate a livello di ceppo, mentre si adatta a decine di migliaia di genomi per dedurre ramificazioni profonde e filogenie di dimensioni molto grandi. PhyloPhlAn 3.0 è sia accurato a livello di ceppo e di specie che veloce quando si adatta all'intero set di genomi disponibili (Asnicar et al., 2020). PhyloPhlAn 3.0 estende l'opzione di default che prevede l'uso di 400 famiglie di geni che sono più prevalenti nelle specie batteriche e negli archea (cioè i marcatori universali) e che sono stati recentemente ulteriormente convalidati per l'uso in analisi filogenetiche su larga scala, con geni marcatori specie-specifici per ogni specie nota o candidata e con la possibilità di utilizzare marcatori definiti dall'utente.

Lo script utilizzato su PhyloPhlAn in questo studio è:

```
-i genomes -o output -d database_pse_fluo --trim greedy --not_variant_threshold 0.99 --remove_fragmentary_entries --fragmentary_threshold 0.67 --diversity medium --mutation_rates -t a -f isolates_config.cfg --force_nucleotides --nproc 4 --verbose 2>&1 | tee logs/phylophlan__output_isolates.log
```

L'allineamento proteico ottenuto da PhyloPhlAn è stato poi utilizzato per costruire un albero filogenetico di massima verosimiglianza con **IQ-Tree2**, eseguendo 1000 iterazioni di bootstrap (Minh et al., 2020). IQ-Tree2 prende in input un allineamento multiplo di sequenze per ricostruire un albero evolutivo che spieghi al meglio i dati, valutando il supporto dei rami tramite l'approccio ultrafast bootstrap. Una rappresentazione grafica dell'albero filogenetico è stata generata con il software **iTOL v6** (Letunic and Bork, 2021), un *software* online normalmente impiegato per la visualizzazione di alberi filogenetici. Il comando utilizzato per questa analisi è il seguente:

```
iqtree2 -s allineamento.aln -alrt 1000 -bb 1000
```

Nei sequenziamenti dei cloni a 4°C e a 22°C sono state osservate delle mutazioni rispetto al genoma di riferimento. Le mutazioni sono state successivamente suddivise e catalogate in: coding e intergeniche. Le prime sono state suddivise a loro volta in missenso, non senso, inserzione/delezione e sinonime. Dopo aver fatto questa suddivisione sono state create delle tabelle suddividendo i dati per tipo di mutazione, tempo e temperatura.

3.5. COMPOSIZIONE TERRENI COLTURALI E SOLUZIONI

I terreni e le soluzioni utilizzati nelle varie analisi sono stati forniti dall'Università degli Studi di Padova.

- Pseudomonas Agar Base (PAB) addizionato con CFC (Cetrimide, Acido Fusidico, Cefalosporina)

Componenti	Quantità (g/l)
Gelatin peptone	16
Agar	11
Idrolisato di caseina	10
Solfato di potassio	10
Cloruro di magnesio	1,4
Cefalosporina	0,05
Acido fusidico	0,01
Cetrimide	0,01

- Tryptone Soy Broth + Yeast Extract (TSB+YE)

Componenti	Quantità (g/l)
Triptone	17
Peptone di soia	3
Cloruro di sodio	5
Fosfato d'idrogeno dipotassico – K_2HPO_4	2,5
Destrosio	2,5
Estratto di lievito	6

- Plate Count Agar (PCA)

Componenti	Quantità (g/l)
Pancreatic digest of casein	5
Yeast extract	2,5
Glucose	1
Agar	15

- Tryptone Soy Agar (TSA)

Componenti	Quantità (g/l)
Triptone	17
Peptone di soia	3
Cloruro di sodio	5
Destrosio	2,5
Fosfato d'idrogeno dipotassico	2,5
Agar	3 o 6*

*è stato usato TSA con una concentrazione di agar di 0,3% e di 0,6%

- Phosphate Buffered Saline (PBS)

Componenti	Quantità (g/l)
Cloruro di sodio	8
Cloruro di potassio	0,2
Fosfato Disodico	1,5
Fosfato di potassio Monobasico	0,2

- Minimal Bacterial Medium (MBM)

Componenti	Quantità (g/l)
K_2HPO_4	7
KH_2PO_4	3
Trisodio citrato $C_6H_5Na_3O_7$ x $2H_2O$	0,5
$MgSO_4$ eptaidrato	0,1
$(NH_4)_2SO_4$	1
Glucosio	2

- PMAxx™ (Biotium)
- RNAlater (Thermo Fisher Scientific)
- Kit Invitrogen Qubit 4

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. MONITORAGGIO DELLE *Long-Term Cultures*

Per studiare la persistenza di *Pseudomonas fluorescens* in condizioni di stress da carenza di nutrienti, sono state allestite e monitorate colture a lungo termine (*long-term cultures*) di tre differenti ceppi: il ceppo di referenza CECT 378 e due isolati di origine alimentare, L3_4 e uk1. Le colture sono state avviate da un inoculo iniziale di circa 10^8 cell/ml, come descritto nel paragrafo 3.2, e sono state valutate periodicamente per determinare l'andamento della conta cellulare, l'identificazione di *persisters* e VBNC, la motilità e le mutazioni. I paragrafi seguenti riportano in dettaglio i risultati ottenuti per ciascuna di queste analisi.

4.2. QUANTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI POPOLAZIONI BATTERICHE: CONTE SU PIASTRA, IDENTIFICAZIONE DEI *PERSISTERS* E DELLE CELLULE VBNC

Per investigare le strategie di sopravvivenza a lungo termine, è stata monitorata la dinamica delle popolazioni del ceppo di riferimento CECT 378 e degli isolati alimentari L3_4 e uk1, incubati a 4°C e 22°C. In questo paragrafo vengono presentati i dati relativi alla vitalità e coltivabilità cellulare.

- **Ceppo CECT 378**

La Figura 30 illustra l'andamento temporale delle sottopopolazioni di cellule coltivabili (CFU), vitali ma non coltivabili (VBNC) e *persisters* per il ceppo di riferimento *P. fluorescens* CECT 378, mantenuto in terreno minimo MBM a 4°C per 730 giorni. Nella Tabella 6 presente nell'Allegato 1 sono riportati i valori utilizzati per la creazione del grafico del ceppo CECT 378 a 4°C.

La conta delle cellule coltivabili (espressa in Log CFU/mL, linea blu) ha rappresentato la frazione predominante per l'intera durata dell'esperimento. Partendo da una concentrazione iniziale di circa 6,38 Log CFU/mL, la popolazione ha mostrato una leggera ma costante diminuzione nel corso dei due anni, attestandosi su un valore finale di circa 7,63 Log CFU/mL.

La sottopopolazione di cellule *persisters* (linea verde), identificate dopo trattamento con kanamicina, ha mostrato un notevole aumento nel tempo. Pressoché assente al tempo zero, la sua concentrazione è cresciuta rapidamente nei primi 120 giorni, raggiungendo un picco di circa 4,6 Log cellule/mL. Successivamente, la frazione di *persisters* si è mantenuta su valori elevati, mostrando una tendenza di ulteriore crescita nella seconda parte dell'esperimento fino a raggiungere una concentrazione finale di 6,18 Log cellule/mL. Questo indica un accumulo progressivo di questa sottopopolazione tollerante all'antibiotico.

Infine, l'andamento delle cellule VBNC (linea arancione), quantificate come differenza tra le cellule totali vitali (PMAxx-qPCR) e quelle coltivabili, ha rivelato un comportamento marcatamente transitorio. La loro presenza, trascurabile all'inizio, è aumentata fino a un picco evidente intorno al giorno 90, con una concentrazione di circa 2,12 Log cellule/mL. Dopo questa fase acuta, la popolazione di VBNC ha subito un progressivo e costante declino per il resto del periodo di incubazione, raggiungendo valori prossimi al limite di rilevabilità al termine dei due anni.

Complessivamente, i dati per il ceppo CECT 378 a 4°C evidenziano una complessa dinamica di adattamento alla bassa temperatura e alla carenza di nutrienti. A fronte di una lieve riduzione della coltivabilità, si osserva un accumulo massiccio e sostenuto di cellule *persisters* nel lungo periodo, mentre la formazione di cellule VBNC appare essere un fenomeno limitato alla fase iniziale di stress.

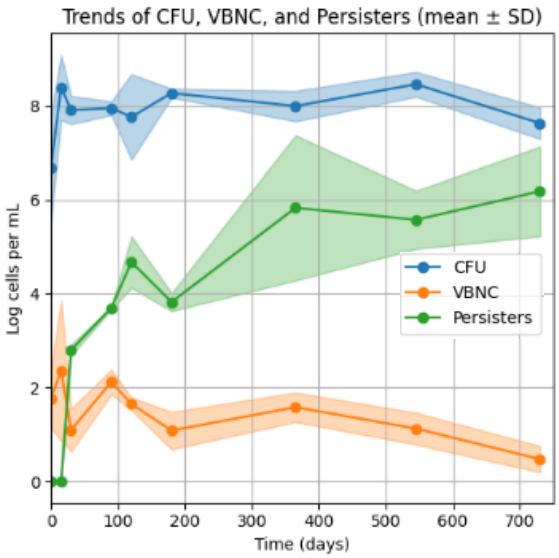

Figura 30: Dinamica delle popolazioni di P. fluorescens CECT 378 a 4°C. Andamento della concentrazione media (± deviazione standard) di cellule coltivabili (CFU, linea blu), cellule persisters (linea verde) e cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, linea arancione) nel corso di 730 giorni di incubazione in MBM. Le concentrazioni sono espresse come Log cellule/mL.

Parallelamente, è stata analizzata la dinamica delle popolazioni del ceppo CECT 378 incubato a 22°C, con i risultati riportati in Figura 31. Nella Tabella 7 presente nell'Allegato 2 sono riportati i valori utilizzati per la creazione del grafico del ceppo CECT 378 a 22°C.

La popolazione coltivabile (linea blu) ha mostrato un andamento differente rispetto alla condizione a 4°C. Partendo da una concentrazione iniziale di circa 4,72 Log CFU/mL, si è osservato un aumento e un successivo calo progressivo e più pronunciato lungo i 730 giorni, che ha portato la conta finale a un valore inferiore a 7 Log CFU/mL. Questo indica una minor stabilità della popolazione coltivabile a temperatura ambiente in condizioni di carenza nutrizionale.

Anche la sottopopolazione di cellule *persisters* (linea verde) ha seguito una dinamica diversa. Si è registrato un rapido incremento iniziale che ha portato a un picco marcato di circa 4,14 Log cellule/mL al giorno 90. Tuttavia, a differenza di quanto osservato a 4°C, questo picco è risultato transitorio. Nei tempi successivi, la concentrazione di *persisters* è diminuita costantemente, attestandosi su un valore finale di circa 3,68 Log cellule/mL.

Al contrario, la frazione di cellule VBNC (linea arancione) ha mostrato una forte riduzione al giorno 30 raggiungendo una concentrazione di circa 1,46 Log cellule/mL. Il trend è rimasto più o meno costante per tutta la durata dell'esperimento fino a raggiungere una concentrazione di circa 2,0 Log cellule/mL al giorno 365, per poi diminuire lentamente fino a valori prossimi allo 0 al giorno 730.

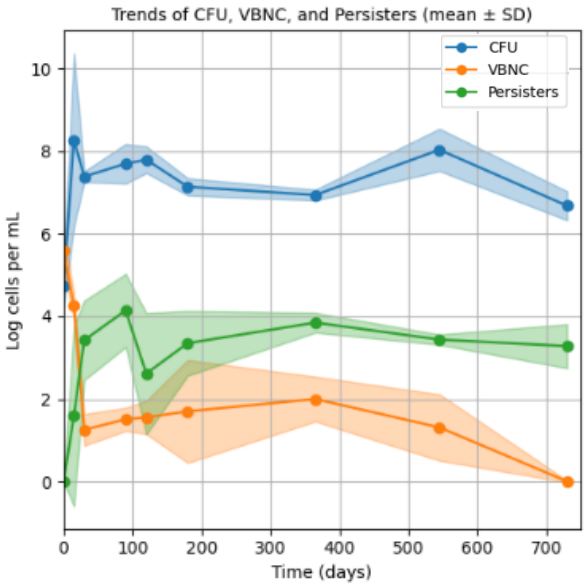

Figura 31: Dinamica delle popolazioni di P. fluorescens CECT 378 a 22°C. Andamento della concentrazione media (± deviazione standard) di cellule coltivabili (CFU, linea blu), cellule persisters (linea verde) e cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, linea arancione) nel corso di 730 giorni di incubazione in MBM. Le concentrazioni sono espresse come Log cellule/mL.

Il confronto tra le dinamiche di sopravvivenza del ceppo CECT 378 alle due temperature di incubazione, 4°C e 22°C, rivela l'adozione di strategie di persistenza nettamente distinte e temperatura-dipendenti, evidenziando una chiara divergenza nei percorsi evolutivi.

L'osservazione più rilevante riguarda il ruolo delle sottopopolazioni dormienti nel lungo periodo. A 4°C, la strategia di sopravvivenza predominante si basa sull'accumulo massiccio e stabile di una popolazione di cellule *persisters*. Questa sottopopolazione cresce costantemente fino a superare i 6 Log, indicando una forte pressione selettiva verso questo fenotipo in condizioni di freddo. La formazione di cellule VBNC, al contrario, rappresenta un fenomeno acuto e transitorio.

A 22°C, si delinea uno scenario completamente diverso. La formazione di cellule *persisters* assume le caratteristiche di una risposta di stress iniziale e di breve durata: dopo aver raggiunto il picco di 4,14 Log cellule/mL al giorno 90, la loro concentrazione diminuisce progressivamente. In queste condizioni, sono le cellule VBNC a mostrare una relativa stabilità nella fase intermedia dell'esperimento, prima di diminuire verso la fine. L'elemento più significativo a 22°C è il calo marcato della popolazione coltivabile (CFU) nella seconda metà dell'esperimento, suggerendo una maggiore mortalità complessiva rispetto alla condizione refrigerata.

In sintesi, i dati indicano che *P. fluorescens* CECT 378 modula le sue strategie di sopravvivenza in base alla temperatura: in condizioni di refrigerazione, favorisce un fenotipo *persister* robusto e duraturo come principale meccanismo di persistenza. A temperatura ambiente, invece, la popolazione appare complessivamente meno resiliente, con risposte di persistenza più transitorie e un declino generale più significativo.

- **Ceppo L3_4 (ps_20)**

È stata quindi analizzata la dinamica di sopravvivenza dell'isolato di origine alimentare *P. fluorescens* L3_4, incubato a 4°C. I risultati, illustrati in Figura 32, mostrano un comportamento distintivo rispetto al ceppo di riferimento. Nella Tabella 8 presente nell'Allegato 3 sono riportati i valori utilizzati per la creazione del grafico del ceppo L3_4 a 4°C.

La popolazione coltivabile (linea blu) ha evidenziato una forte sensibilità allo stress iniziale. Partendo da una concentrazione di 8,51 CFU/ml è arrivata ad una superiore a 10 Log CFU/mL, si è registrato un drastico calo di circa 2 ordini di grandezza nei primi 30 giorni di incubazione. Successivamente a questa fase di mortalità iniziale, la popolazione si è stabilizzata, mantenendo una conta relativamente costante, attorno a 8 Log CFU/mL, per la restante durata dell'esperimento, con una lieve flessione finale.

La frazione di cellule VBNC (linea arancione) non sembra rappresentare una strategia di sopravvivenza rilevante per questo ceppo in queste condizioni. Nonostante una concentrazione iniziale di circa 2,4 Log cellule/mL, questa sottopopolazione ha subito un rapido declino, raggiungendo valori prossimi al limite di rilevabilità entro i primi 100 giorni e rimanendovi per tutto il periodo di osservazione.

L'andamento della sottopopolazione di cellule *persisters* (linea verde) è risultato particolarmente dinamico e ha mostrato un comportamento bifasico. È stato osservato un primo, modesto picco transitorio intorno al giorno 120, con una concentrazione di circa 0,8 Log cellule/mL. Questo è stato seguito da un lungo periodo di latenza, tra il giorno 180 e il giorno 545, in cui la concentrazione è tornata a livelli non rilevabili. Nella fase finale

dell'esperimento, tuttavia, si è assistito a un drastico e repentino aumento della popolazione *persister*, che ha raggiunto un picco di quasi 3,8 Log cellule/mL al giorno 730.

Complessivamente, la sopravvivenza del ceppo L3_4 a 4°C è caratterizzata da un'elevata mortalità iniziale, una successiva stabilizzazione della popolazione coltivabile e, soprattutto, da una strategia di persistenza tardiva, con un'emergenza massiccia di cellule *persisters* solo dopo un lungo periodo di incubazione.

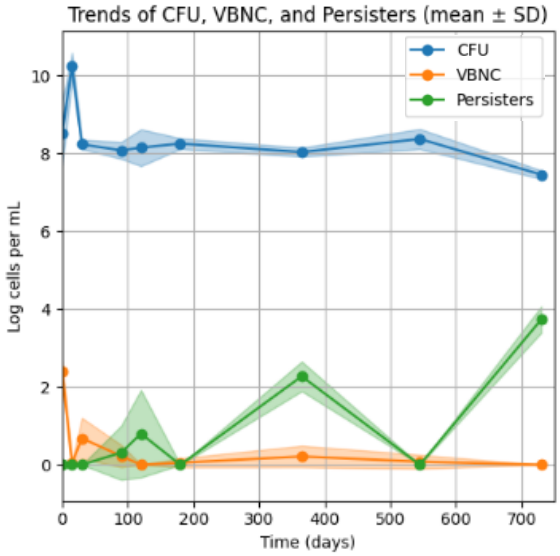

Figura 32: Dinamica delle popolazioni di P. fluorescens L3_4 a 4°C. Andamento della concentrazione media (± deviazione standard) di cellule coltivabili (CFU, linea blu), cellule persisters (linea verde) e cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, linea arancione) nel corso di 730 giorni di incubazione in MBM. Le concentrazioni sono espresse come Log cellule/mL.

L'analisi dell'isolato alimentare *P. fluorescens* L3_4 incubato a 22°C è illustrata in Figura 33**.** Anche in queste condizioni, il ceppo ha mostrato una dinamica di sopravvivenza peculiare. Nella Tabella 9 presente nell'Allegato 4 sono riportati i valori utilizzati per la creazione del grafico del ceppo L3_4 a 22°C.

La popolazione coltivabile (linea blu), dopo una conta iniziale superiore a 8,54 Log CFU/mL, ha subito una marcata riduzione nei primi 30 giorni. Successivamente, ha mostrato un andamento fluttuante, con un calo che ha raggiunto 7,2 Log CFU/mL al giorno 365, seguito da un parziale recupero nella fase finale dell'esperimento, fino a un valore di circa 6,8 Log CFU/mL al giorno 730.

L'andamento delle popolazioni dormienti è apparso dominato da una risposta transitoria. Sia le cellule VBNC (linea arancione) che le cellule *persisters* (linea verde) hanno mostrato la loro presenza quasi esclusivamente nella fase iniziale dell'esperimento. In particolare, la sottopopolazione *persister* ha raggiunto un picco di circa 2,4 Log cellule/mL al giorno 90, per poi diminuire progressivamente fino a livelli prossimi al limite di rilevabilità dopo il giorno 545. Similmente, la popolazione VBNC, dopo un picco iniziale, è decaduta rapidamente, rimanendo a concentrazioni trascurabili per la maggior parte del periodo di osservazione.

Complessivamente, i risultati per il ceppo L3_4 a 22°C indicano una bassa propensione a entrare in stati di dormienza a lungo termine (sia VBNC che *persisters*) in queste condizioni. La sopravvivenza sembra

dipendere principalmente dalla resilienza della frazione coltivabile, la quale, pur subendo una significativa mortalità, riesce a mantenersi nel tempo.

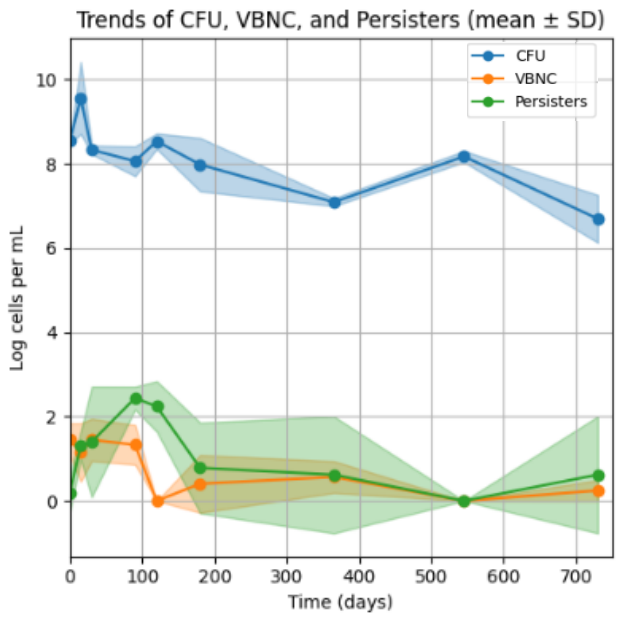

Figura 33: Dinamica delle popolazioni di P. fluorescens L3_4 a 22°C. Andamento della concentrazione media (± deviazione standard) di cellule coltivabili (CFU, linea blu), cellule persisters (linea verde) e cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, linea arancione) nel corso di 730 giorni di incubazione in MBM. Le concentrazioni sono espresse come Log cellule/mL.

Il confronto diretto tra le dinamiche di sopravvivenza del ceppo *P. fluorescens* L3_4 alle due temperature di incubazione (4°C e 22°C) rivela strategie di adattamento notevolmente diverse, in particolare per quanto riguarda la tempistica e la natura della formazione delle sottopopolazioni dormienti.

Un tratto comune a entrambe le condizioni è la marcata sensibilità del ceppo allo stress iniziale, evidenziata dal drastico calo della popolazione coltivabile (CFU) nei primi 30 giorni. Tuttavia, l'andamento successivo diverge: a 4°C, dopo il calo iniziale, la popolazione coltivabile dimostra una notevole stabilità, mantenendosi su valori costanti per quasi due anni mentre a 22°C la popolazione mostra fluttuazioni significative e un declino generale più marcato nel lungo periodo.

Per quanto riguarda gli stati dormienti, la formazione di cellule VBNC non sembra costituire una strategia di sopravvivenza rilevante per il ceppo L3_4 in nessuna delle due condizioni. In entrambi i casi, la loro presenza è limitata alla fase iniziale e decade rapidamente a livelli trascurabili.

La differenza più sostanziale e significativa si osserva nell'andamento della popolazione *persisters*. A 4°C, la formazione di *persisters* è un fenomeno tardivo suggerendo una strategia di sopravvivenza a lungo termine che si attiva solo dopo un'esposizione prolungata allo stress da freddo. A 22°C, invece, la dinamica dei *persisters* assume le caratteristiche di una risposta di stress acuta e transitoria. Si osserva un unico picco pronunciato nella fase iniziale (giorno 90), seguito da un costante declino, indicando che non vengono mantenuti come strategia di sopravvivenza a lungo termine.

- **Ceppo uk1 (ps_77)**

L'analisi è proseguita con lo studio dell'isolato di origine alimentare *P. fluorescens* uk1, incubato a 4°C. I risultati, riportati in Figura 34, delineano un'ulteriore strategia di sopravvivenza. Nella Tabella 10 presente nell'Allegato 5 sono riportati i valori utilizzati per la creazione del grafico del ceppo uk1 a 4°C.

La popolazione coltivabile (linea blu) di questo ceppo ha dimostrato una notevole resilienza e stabilità in condizioni di stress. Dopo una breve fluttuazione iniziale, la conta si è mantenuta su valori elevati e costanti, compresi tra 7 e 8 Log CFU/mL, per la maggior parte dei 730 giorni, indicando una robusta capacità di sopravvivenza della frazione metabolicamente attiva.

L'andamento delle sottopopolazioni dormienti ha rivelato due strategie temporalmente separate. La formazione di cellule VBNC (linea arancione) si è manifestata come una risposta di stress estremamente acuta e transitoria. Questa popolazione ha subito un rapido e massiccio accumulo, raggiungendo un picco di circa 4,2 Log cellule/mL tra il giorno 30 e il giorno 90. Tuttavia, questa fase è stata seguita da un crollo altrettanto rapido, con la popolazione VBNC che è tornata a livelli trascurabili dopo i primi 180 giorni.

Al contrario, la formazione di cellule *persisters* (linea verde) ha seguito una dinamica di accumulo lento, progressivo e a lungo termine. Partendo da livelli non rilevabili, la loro concentrazione è aumentata costantemente per tutta la durata dell'esperimento, senza mostrare picchi acuti, fino a raggiungere un valore finale di circa 3,3 Log cellule/mL.

Complessivamente, il ceppo uk1 a 4°C mostra una strategia di sopravvivenza complessa e ben definita: una forte stabilità della popolazione coltivabile, una risposta VBNC massiccia ma di breve durata per superare lo shock iniziale, e una successiva e graduale adozione del fenotipo *persister* come meccanismo di persistenza a lungo termine.

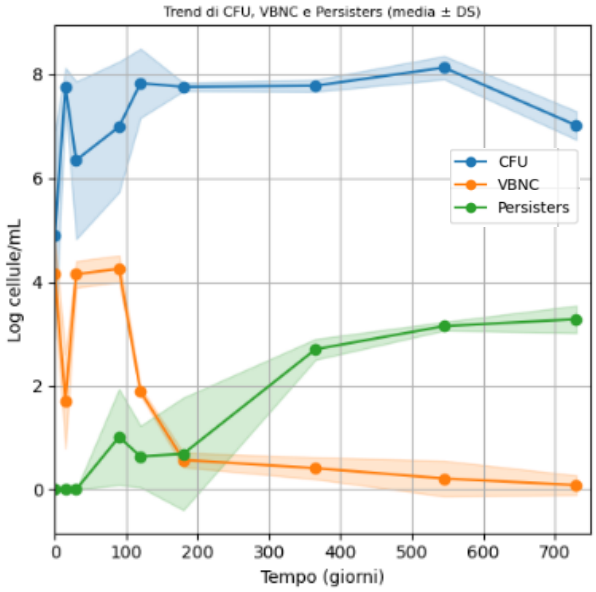

Figura 34: Dinamica delle popolazioni di P. fluorescens uk1 a 4°C. Andamento della concentrazione media (± deviazione standard) di cellule coltivabili (CFU, linea blu), cellule persisters (linea verde) e cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, linea arancione) nel corso di 730 giorni di incubazione in MBM. Le concentrazioni sono espresse come Log cellule/mL.

Infine, è stata analizzata la dinamica di sopravvivenza del ceppo *P. fluorescens* uk1 incubato a 22°C. I risultati, illustrati in Figura 35, mostrano che anche a temperatura ambiente questo isolato mantiene un'elevata resilienza della sua popolazione coltivabile. Nella Tabella 11 presente nell'Allegato 6 sono riportati i valori utilizzati per la creazione del grafico del ceppo uk1 a 22°C.

La conta delle cellule coltivabili (linea blu), dopo un aggiustamento iniziale, ha mostrato una notevole stabilità, mantenendosi su valori compresi tra 6,8 e 8 Log CFU/mL per l'intera durata dell'esperimento. Questo indica una buona capacità del ceppo di tollerare la carenza di nutrienti a temperatura ambiente.

Per quanto riguarda le strategie di dormienza, la formazione di cellule *persisters* (linea verde) è risultata essere un fenomeno quasi del tutto assente in queste condizioni. Ad eccezione di un picco modesto e transitorio intorno al giorno 120, la loro concentrazione è rimasta a livelli non rilevabili.

La dinamica delle cellule VBNC (linea arancione) è apparsa più complessa. Dopo un'elevata concentrazione iniziale e un successivo crollo drastico, si è osservato un secondo periodo di accumulo, che ha portato a un picco di circa 1,8 Log cellule/mL al giorno 365. Tuttavia, anche questa sottopopolazione è risultata transitoria, con la sua concentrazione che è tornata a livelli prossimi allo zero nella fase finale dell'esperimento.

Complessivamente, la strategia di sopravvivenza del ceppo uk1 a 22°C sembra basarsi quasi esclusivamente sulla stabilità della popolazione coltivabile, con un contributo limitato e transitorio da parte delle cellule VBNC e un ruolo trascurabile delle cellule *persisters*.

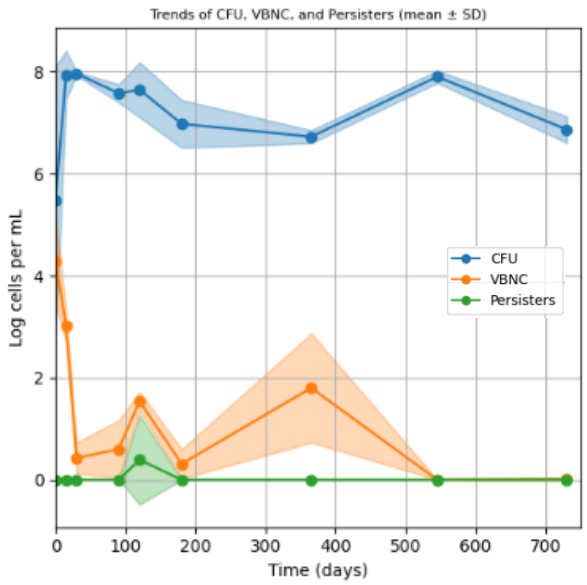

Figura 35: Dinamica delle popolazioni di P. fluorescens uk1 a 22°C. Andamento della concentrazione media (± deviazione standard) di cellule coltivabili (CFU, linea blu), cellule persisters (linea verde) e cellule vitali ma non coltivabili (VBNC, linea arancione) nel corso di 730 giorni di incubazione in MBM. Le concentrazioni sono espresse come Log cellule/mL.

Il confronto delle dinamiche di sopravvivenza del ceppo *P. fluorescens* uk1 a 4°C e a 22°C evidenzia una notevole plasticità fenotipica, con l'adozione di strategie di persistenza completamente diverse in risposta alla temperatura. Un elemento comune a entrambe le condizioni è l'elevata stabilità della popolazione coltivabile (CFU). A differenza degli altri ceppi analizzati, uk1 dimostra una forte resilienza generale, mantenendo alta la sua conta di cellule attive sia a 4°C che a 22°C. Tuttavia, le strategie di dormienza adottate sono diametralmente opposte. A 4°C, il ceppo uk1 adotta una strategia di persistenza a lungo termine basata sull'accumulo lento, costante e progressivo di cellule *persisters*, che raggiungono una concentrazione significativa al termine dei due anni. In questa condizione, la formazione di cellule VBNC è un fenomeno massiccio ma estremamente transitorio, limitato allo shock iniziale. A 22°C, il ruolo delle sottopopolazioni dormienti si inverte. La formazione di *persisters* è quasi completamente soppressa, indicando che questo fenotipo non conferisce un vantaggio selettivo a temperatura ambiente. In sintesi, il ceppo uk1 dimostra una capacità eccezionale di modulare le sue strategie di persistenza. La temperatura agisce come un interruttore che determina quale meccanismo di dormienza viene privilegiato: in condizioni di refrigerazione (4°C), viene attivato un programma a lungo termine di formazione di *persisters*. A temperatura ambiente (22°C), questa strategia viene abbandonata in favore di una risposta VBNC più limitata, affidando la sopravvivenza principalmente alla robustezza della popolazione coltivabile.

L'analisi comparativa delle dinamiche di popolazione dei tre ceppi di *P. fluorescens* in condizioni di Long-Term Stationary Phase (LTSP) rivela una notevole eterogeneità nelle strategie di sopravvivenza, suggerendo percorsi di adattamento specifici per ogni ceppo e fortemente influenzati dalla temperatura. Il ceppo di riferimento **CECT 378** mostra una plasticità fenotipica temperatura-dipendente. A 4°C adotta una strategia di persistenza a lungo termine basata sull'accumulo massiccio e stabile di cellule ***persisters***. A 22°C, questa strategia viene abbandonata in favore di una risposta VBNC più transitoria, a fronte di un generale declino della popolazione coltivabile. Il ceppo **L3_4** di origine alimentare si distingue per la sua elevata mortalità iniziale in entrambe le condizioni. La sua strategia a 4°C è unica, caratterizzata da un'emergenza tardiva ed esplosiva di cellule ***persisters*** dopo un lungo periodo di latenza. A 22°C, invece, le sue risposte di persistenza (sia VBNC che *persister*) sono deboli e transitorie. Infine, il ceppo **uk1**, anch'esso di origine alimentare, si dimostra il più resiliente dei tre, mantenendo una popolazione coltivabile molto stabile in entrambe le temperature. Anche uk1 modula le sue strategie dormienti in base alla temperatura, ma in modo diverso dal ceppo CECT 378: a 4°C favorisce un accumulo lento e progressivo di ***persisters***, mentre a 22°C sopprime quasi completamente questa via, affidandosi a una risposta VBNC limitata e transitoria. Complessivamente, i dati evidenziano che non esiste una singola strategia di sopravvivenza in LTSP per *P. fluorescens*. Il ceppo di riferimento e i due isolati alimentari mostrano fenotipi di persistenza distinti, in cui la temperatura modula non solo l'intensità ma anche la tempistica delle risposte di sopravvivenza.

Le basse temperature, come quelle di refrigerazione (4°C), impongono una notevole pressione selettiva sui batteri mesofili come *Pseudomonas fluorescens*. Per sopravvivere in queste condizioni, la letteratura scientifica descrive meccanismi di adattamento a lungo termine, quali l'espressione di proteine di acclimatazione al freddo (CAPs), che agiscono da regolatori globali, e la rimodulazione della membrana cellulare per mantenerne la fluidità (Craig et al., 2021). Questi adattamenti fisiologici, che rallentano il metabolismo e proteggono le strutture cellulari essenziali, trovano una chiara conferma nei nostri risultati. Infatti, la maggiore stabilità della **frazione coltivabile** (espressa in CFU/mL) osservata a 4°C rispetto al declino registrato a 22°C per tutti i ceppi, può essere interpretata come il risultato fenotipico di una efficace strategia di sopravvivenza al freddo. Mentre la temperatura di 4°C agisce come un 'freno' metabolico, conservando le risorse e la vitalità cellulare per un periodo prolungato, la temperatura ambiente (22°C), pur essendo più vicina all'ottimale per la crescita, in condizioni di carenza di nutrienti accelera l'esaurimento delle risorse residue e l'accumulo di cataboliti tossici, portando a una maggiore mortalità. Pertanto, la resilienza della popolazione coltivabile a 4°C non è un fenomeno passivo, ma una diretta conseguenza dell'adattamento evolutivo di *P. fluorescens* agli ambienti freddi, un tratto che ne sottolinea il potenziale alterativo nei prodotti refrigerati.

Le strategie di sopravvivenza nettamente divergenti che abbiamo osservato a 4°C e 22°C possono essere ricondotte a una diversa sintonizzazione dei principali network regolatori dello stress batterico. Come ampiamente descritto, la formazione di cellule ***persisters*** è una risposta adattativa orchestrata da una complessa rete di vie di segnalazione, al centro della quale si trova la molecola alarmone (p)ppGpp (Van den Bergh et al., 2017; Liu et al.,2015). A 4°C, lo stress fisico e metabolico persistente indotto dal freddo può agire come un potente e continuo segnale per l'attivazione della Risposta Stringente. L'accumulo di (p)ppGpp funge da 'freno' metabolico, rallentando i processi cellulari e riorientando la cellula verso uno stato di sopravvivenza (Liu et al., 2015). A livello molecolare, l'alta concentrazione di (p)ppGpp è un noto attivatore dei sistemi tossina-antitossina (TA), che sono gli effettori finali dell'induzione della dormienza. Questo modello, descritto per *E. coli*, prevede che (p)ppGpp porti all'attivazione della proteasi Lon, che a sua volta degrada le antitossine labili, liberando le tossine che arrestano la crescita (Maisonneuve et al., 2013). Questo meccanismo offre una spiegazione possibile per l'accumulo massiccio e stabile della sottopopolazione *persister* che abbiamo osservato in queste condizioni. Al contrario, a 22°C, dove lo stress dominante è la rapida carenza di nutrienti, l'attivazione della Risposta Stringente potrebbe essere più transitoria. Ciò spiegherebbe i picchi temporanei di *persisters* seguiti da un declino, osservati in alcuni ceppi, e un calo generale della popolazione coltivabile dovuto al più rapido esaurimento delle risorse. I nostri dati, quindi, suggeriscono che la temperatura agisce come un modulatore che sbilancia l'equilibrio di questo network regolatorio, favorendo a basse temperature una strategia di sopravvivenza a lungo termine basata sulla dormienza indotta.

La formazione di **cellule vitali ma non coltivabili** (VBNC) rappresenta una delle strategie di sopravvivenza che abbiamo investigato. Questo stato di dormienza è una risposta ben documentata a una varietà di stress ambientali, inclusa la carenza di nutrienti e le temperature sub-ottimali, condizioni che caratterizzano il nostro sistema sperimentale in LTSP (İzgördü et al., 2022). Le cellule VBNC, pur essendo metabolicamente attive, perdono la capacità di formare colonie su terreni di coltura standard, un fenotipo che abbiamo quantificato come la differenza tra le conte totali di cellule vitali (PMAxx-qPCR) e quelle coltivabili (CFU). I nostri risultati indicano che la propensione a entrare nello stato VBNC è una strategia altamente dinamica e ceppo-specifica. Ad esempio, per il ceppo di riferimento CECT 378, abbiamo osservato un picco transitorio di cellule VBNC durante la fase iniziale dello stress, sia a 4°C che a 22°C, seguito da un progressivo declino. Questo andamento suggerisce che lo stato VBNC potrebbe rappresentare una risposta di acclimatazione acuta allo shock iniziale della carenza di nutrienti, piuttosto che una strategia di sopravvivenza a lungo termine per questo ceppo. Durante questa fase, le cellule subiscono una profonda riprogrammazione fisiologica, che include modifiche alla struttura della membrana e della parete cellulare per aumentare la resistenza (İzgördü et al., 2022). È interessante notare che, mentre la frazione VBNC diminuisce nel tempo, la popolazione coltivabile (CFU) e, in alcuni casi, quella dei *persisters*, si stabilizzano o aumentano. Questo scenario si inserisce perfettamente nel modello della Long-Term Stationary Phase (LTSP) come un ambiente evolutivo dinamico. Invece di una dormienza passiva, la LTSP è caratterizzata da un continuo ciclo di morte cellulare e replicazione, dove mutanti adattati con un vantaggio di crescita in fase stazionaria (fenotipo GASP) emergono e si affermano (Finkel, 2006; Katz et al., 2021). In questo contesto, la diminuzione delle cellule VBNC potrebbe indicare che, una volta superato lo shock iniziale, la selezione favorisce fenotipi in grado di competere attivamente per le risorse rilasciate dalla lisi cellulare, piuttosto che entrare in uno stato di dormienza non replicativa come quello VBNC.

4.3. MOTILITA'

Per investigare le variazioni fenotipiche legate alla capacità di movimento durante l'incubazione a lungo termine, è stata valutata la motilità dei ceppi in esame. Come descritto nel capitolo Materiali e Metodi (paragrafo 3.4.4), sono state analizzate due distinte forme di movimento: la motilità *swimming*, che rappresenta il movimento di singole cellule in un mezzo liquido, e la motilità *swarming*, un movimento collettivo su superficie. La capacità di diffusione di ciascun ceppo è stata quantificata misurando l'area della crescita batterica (espressa in cm^2) a partire dal punto di inoculo su terreno semisolido. I paragrafi seguenti riportano i risultati ottenuti per ciascun ceppo alle due diverse temperature di incubazione (4°C e 22°C), evidenziando le differenze osservate nei vari punti temporali. Per quanto riguarda i dati relativi alla motilità, è stata presa la decisione di non procedere con un'analisi statistica quantitativa. Questa scelta è motivata principalmente dall'osservazione di un'elevata variabilità intrinseca tra le repliche biologiche e tecniche. Riteniamo che tale variabilità possa riflettere la presenza di sottopopolazioni all'interno della comunità microbica studiata, ciascuna caratterizzata da fenotipi di motilità distinti. In un contesto in cui la popolazione non è omogenea, l'applicazione di un'analisi statistica standard potrebbe non solo essere fuorviante, ma anche compromettere la corretta interpretazione dei risultati, mascherando le dinamiche sottostanti delle singole sottopopolazioni. A supporto di questa decisione, abbiamo considerato anche l'esperienza di studi precedenti. In particolare, nella tesi di Matteo Meneghello (Università degli Studi di Padova), sono state condotte analisi statistiche su dati di motilità e formazione di biofilm. Tuttavia, in quel contesto, l'elevata variabilità osservata aveva reso l'interpretazione dei risultati statistici particolarmente complessa e di difficile significatività. Pertanto, per i dati fenotipici relativi alla motilità presentati in questo lavoro, si è optato per un approccio più qualitativo, che si concentra sulla descrizione delle tendenze e delle differenze osservabili, senza forzare un'interpretazione quantitativa che potrebbe non essere appropriata data la natura eterogenea dei campioni.

4.3.1. *SWIMMING* 4°C e 22°C

- **Ceppo CECT 378**

  La Figura 36 mostra le immagini rappresentative dei saggi di motilità *swimming* per il ceppo di riferimento CECT 378, incubato a 4°C e 22°C, a diversi punti temporali (0, 30, 180, 365 e 730 giorni). L'analisi visiva delle piastre rivela un andamento evolutivo marcatamente divergente per questo fenotipo in risposta alla temperatura di incubazione.

  A 4°C (riga superiore), si osserva un progressivo e significativo aumento della motilità *swimming* nel tempo. Partendo da una crescita contenuta e localizzata al punto di inoculo al tempo zero, il ceppo ha mostrato una capacità di diffusione via via maggiore. A partire dal giorno 180, il fenotipo è cambiato drasticamente, con una crescita espansa e a morfologia irregolare. Nei tempi successivi (365 e 730 giorni), il ceppo ha mostrato una crescita diffusa che ha colonizzato gran parte della superficie della piastra.

A 22°C (riga inferiore), si è verificato il fenomeno opposto, ovvero una progressiva perdita della motilità *swimming*. Sebbene al giorno 30 si noti un cambiamento morfologico della colonia, nei punti temporali successivi (180 e 365 giorni) la crescita batterica appare confinata al punto di inoculo, risultando persino più piccola e compatta rispetto al ceppo ancestrale (giorno 0). Al termine dell'esperimento (730 giorni), la colonia centrale è rimasta non motile, sebbene sia comparsa una debole zona di crescita più diffusa.

Complessivamente, l'analisi qualitativa indica che la pressione selettiva esercitata dalle diverse temperature ha promosso percorsi evolutivi opposti per la motilità *swimming* nel ceppo CECT 378: un forte potenziamento in condizioni di refrigerazione e una quasi totale soppressione a temperatura ambiente.

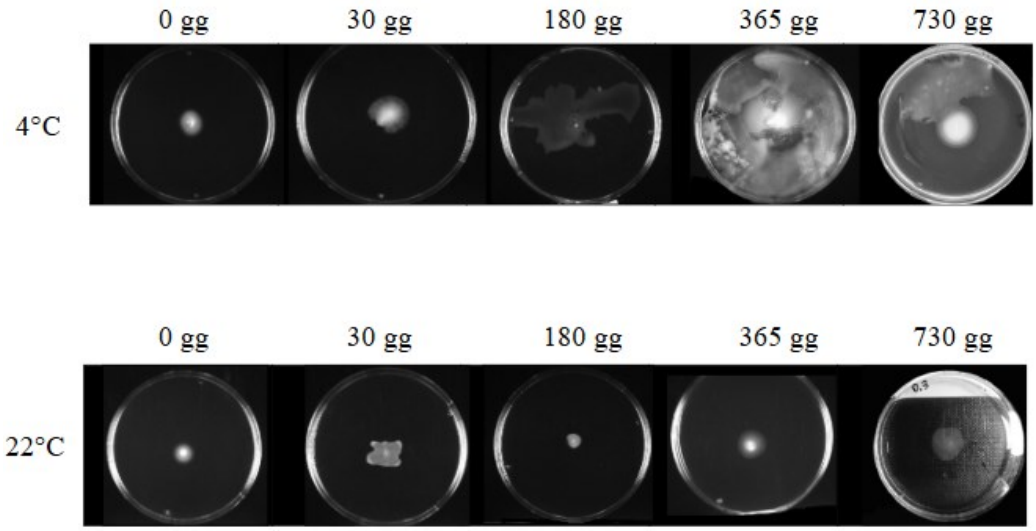

Figura 36: Analisi qualitativa della motilità swimming del ceppo P. fluorescens CECT 378. Immagini rappresentative delle piastre di agar semisolido (0,3% TSA) inoculate con colture evolute a 4°C (riga superiore) e 22°C (riga inferiore) a diversi intervalli di tempo (gg = giorni).

- **Ceppo L3_4**

Le immagini rappresentative dei saggi di motilità *swimming* per il ceppo L3_4 sono riportate in Figura 37. A 4°C (riga superiore), il ceppo L3_4 ha mostrato un drammatico aumento della motilità *swimming* nel corso dell'esperimento. Partendo da una colonia compatta, già a 30 giorni ha sviluppato una morfologia di crescita espansa. Nei punti temporali successivi (da 180 a 730 giorni), questa morfologia strutturata è stata sostituita da un fenotipo maggiormente diffuso, con una crescita nuvolosa che ha progressivamente colonizzato l'intera superficie della piastra.

A 22°C (riga inferiore), è stato osservato il percorso evolutivo opposto. A differenza della condizione a 4°C, il ceppo al giorno 0 si presentava già motile e diffuso. Questa motilità si è mantenuta fino al giorno 30, ma a partire dal giorno 180 si è assistito a una drastica perdita della capacità di *swimming*. Il ceppo ha infatti adottato una morfologia di crescita compatta, densa e strutturata con anelli

concentrici, che si è mantenuta fino al termine dell'esperimento. Al giorno 730, sebbene la colonia centrale rimanesse non motile, si è notata la ricomparsa di un debole alone di crescita.

In sintesi, l'analisi visiva dimostra in modo inequivocabile che le due temperature hanno guidato l'evoluzione della motilità *swimming* del ceppo L3_4 in direzioni opposte: un potenziamento verso la motilità a 4°C e una forte repressione con cambiamento morfologico a 22°C.

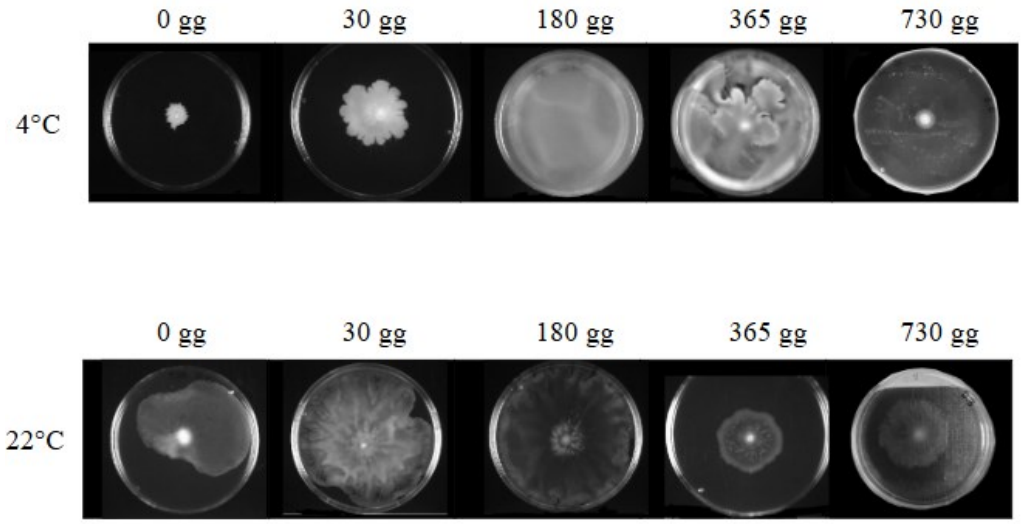

Figura 37: Analisi qualitativa della motilità swimming del ceppo P. fluorescens L3_4. Immagini rappresentative delle piastre di agar semisolido (0,3% TSA) inoculate con colture evolute a 4°C (riga superiore) e 22°C (riga inferiore) a diversi intervalli di tempo (gg = giorni)

- **Ceppo uk1**

Le immagini rappresentative dei saggi di motilità *swimming* per il ceppo *P. fluorescens* uk1 sono illustrate in Figura 38. Anche per questo isolato, sono emersi percorsi evolutivi divergenti in risposta alla temperatura.

A 4°C (riga superiore), il ceppo uk1 ha mostrato una notevole plasticità nella morfologia di crescita. Partendo da un fenotipo già motile al tempo zero, ha sviluppato una morfologia ramificata al giorno 30. Questa fase è stata seguita da una temporanea repressione della motilità al giorno 180, per poi evolvere, al termine dell'esperimento (giorno 730), in una forma altamente strutturata, caratterizzata da evidenti raggi che si dipartono dal centro della colonia.

A 22°C (riga inferiore), al contrario, si è assistito a una progressiva e costante perdita della motilità *swimming*. Il ceppo, che al tempo zero mostrava una buona capacità di diffusione, ha visto ridursi gradualmente l'area di crescita nei punti temporali successivi, fino a una quasi totale scomparsa al giorno 730, dove la crescita appariva confinata a un piccolo e denso alone.

In sintesi, anche per il ceppo uk1 l'evoluzione della motilità *swimming* è risultata opposta nelle due condizioni: un'evoluzione verso forme complesse e motili a 4°C e una graduale soppressione a 22°C.

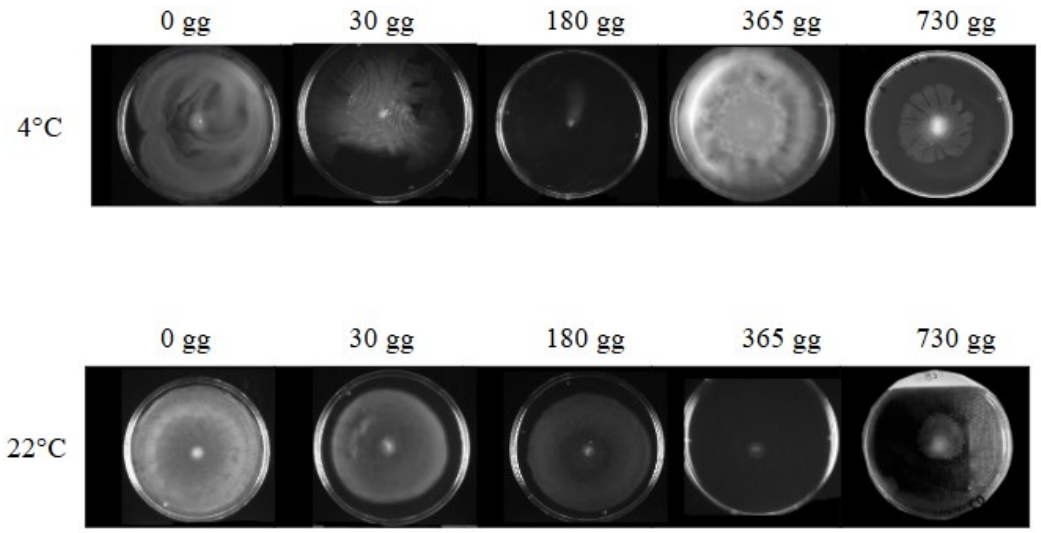

Figura 38: Analisi qualitativa della motilità swimming del ceppo P. fluorescens uk1. Immagini rappresentative delle piastre di agar semisolido (0,3% TSA) inoculate con colture evolute a 4°C (riga superiore) e 22°C (riga inferiore) a diversi intervalli di tempo (gg = giorni)

A complemento dell'analisi qualitativa visiva, sono state effettuate le misurazioni quantitative dell'area di diffusione (in cm^2) per ciascun ceppo e punto temporale. Tuttavia, come si evince dai dati riportati nelle Tabelle 12, 13 e 14, i risultati quantitativi hanno mostrato un'elevata variabilità tra le repliche tecniche, evidenziata dalle ampie deviazioni standard. Per completezza e a dimostrazione della variabilità riscontrata, si riportano nell'Allegato 7 le tabelle riassuntive con le aree medie di crescita e le relative deviazioni standard.

4.3.2. *SWARMING* 4°C e 22°C

- **Ceppo CECT 378**

La capacità di motilità *swarming* del ceppo di riferimento CECT 378 è stata valutata qualitativamente, e i risultati sono mostrati in Figura 39. Anche per questo tipo di motilità, sono emersi percorsi evolutivi nettamente divergenti in risposta alla temperatura.

A 4°C (riga superiore), il ceppo CECT 378 ha mantenuto e potenziato la sua capacità di *swarming* per tutta la durata dell'esperimento. Partendo da un fenotipo già motile, il ceppo ha mostrato una crescita diffusa e superficiale in tutti i punti temporali analizzati, con un picco di espansione osservato attorno al giorno 180.

A 22°C (riga inferiore), al contrario, si è assistito a una perdita rapida, completa e stabile della motilità *swarming*. Già a partire dal giorno 30, il ceppo ha perso la capacità di diffondersi sulla superficie dell'agar. Questo fenotipo non-motile si è mantenuto stabilmente per i successivi due anni, con la crescita che è rimasta costantemente confinata al punto di inoculo, formando colonie piccole e circoscritte.

In conclusione, l'analisi visiva dimostra che la pressione selettiva a 22°C ha portato alla rapida fissazione di un fenotipo non-*swarming*, mentre le condizioni di refrigerazione a 4°C hanno favorito il mantenimento di una popolazione motile.

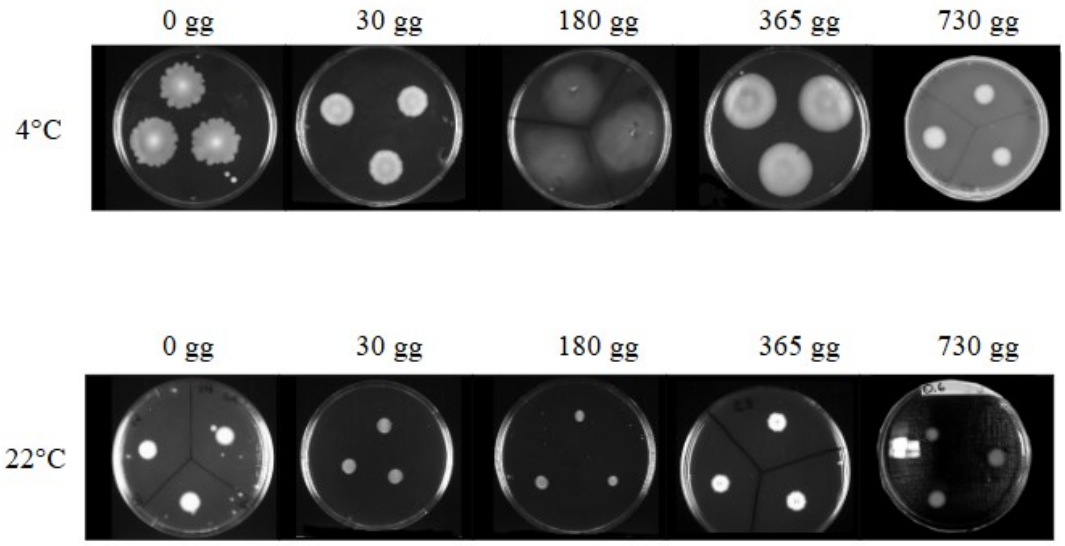

Figura 39: Analisi qualitativa della motilità swarming del ceppo P. fluorescens CECT 378. Immagini rappresentative delle piastre di agar semisolido (0,6% TSA) inoculate con colture evolute a 4°C (riga superiore) e 22°C (riga inferiore) a diversi intervalli di tempo (gg = giorni).

L'analisi quantitativa, basata sulla misurazione dell'area media di diffusione (cm^2) (Figura 40), ha confermato e rafforzato le osservazioni qualitative.

Per il ceppo CECT incubato a 4°C (linea blu), i dati mostrano un andamento dinamico della motilità *swarming*. Dopo un'iniziale riduzione, si è registrato un picco significativo al giorno 180, con un'area media di diffusione di 8,83 cm^2. Successivamente, la capacità di *swarming* è diminuita progressivamente fino al termine dell'esperimento. È importante notare, come riportato in Tabella 8, che i dati a questa temperatura presentano una notevole variabilità tra le repliche, specialmente nei punti a 0, 180 e 365 giorni, indicando un'eterogeneità fenotipica nella popolazione.

Per il ceppo incubato a 22°C (linea arancione), i dati quantitativi confermano in modo inequivocabile la rapida e completa perdita della motilità. L'area media di diffusione, già bassa al tempo zero (0,99 cm^2), è crollata a valori trascurabili (media ≈ 0,28 cm^2) già al giorno 30 e si è mantenuta tale per i successivi due anni. Come evidenziato dalla Tabella 15 in Allegato 8, le deviazioni standard estremamente basse in tutti i punti temporali indicano che la perdita di motilità è stato un evento omogeneo e stabile per l'intera popolazione.

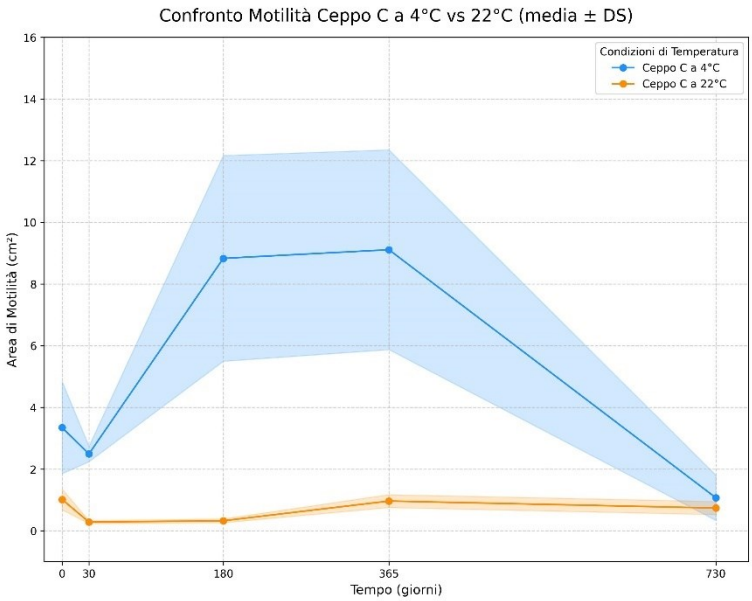

Figura 40: Evoluzione della motilità swarming del ceppo CECT 378 a 4°C e 22°C. Il grafico riporta l'area media di diffusione (cm^2 ± DS) misurata a diversi intervalli di tempo

- **Ceppo L3_4**

L'evoluzione della motilità *swarming* è stata analizzata anche per il ceppo L3_4, come mostrato in Figura 41. I risultati rivelano dinamiche complesse e percorsi evolutivi opposti tra le due condizioni di temperatura. A 4°C (riga superiore), il ceppo L3_4 ha mostrato un andamento peculiare, con un'attivazione tardiva e transitoria della motilità. Il ceppo si è presentato come non-motile per i primi 180 giorni di incubazione. Successivamente, al giorno 365, ha sviluppato improvvisamente un fenotipo motile, con una morfologia di crescita espansa e ramificata. Tuttavia, questo tratto è risultato instabile, poiché al termine dell'esperimento (giorno 730) il ceppo è tornato a un fenotipo non-motile.

A 22°C (riga inferiore), si è osservato il percorso inverso, con un'acquisizione rapida e stabile della capacità di *swarming*. Partendo da un fenotipo sostanzialmente non-motile, il ceppo ha sviluppato una notevole motilità superficiale già a partire dal giorno 30. Questo fenotipo motile, caratterizzato da una morfologia complessa e ramificata, è stato mantenuto e potenziato per l'intera durata dei due anni di esperimento.

In sintesi, per il ceppo L3_4, la temperatura ha agito come un interruttore per l'evoluzione della motilità *swarming*: a 22°C ha promosso l'acquisizione e il mantenimento di questo tratto, mentre a 4°C ne ha permesso solo un'espressione temporanea e tardiva.

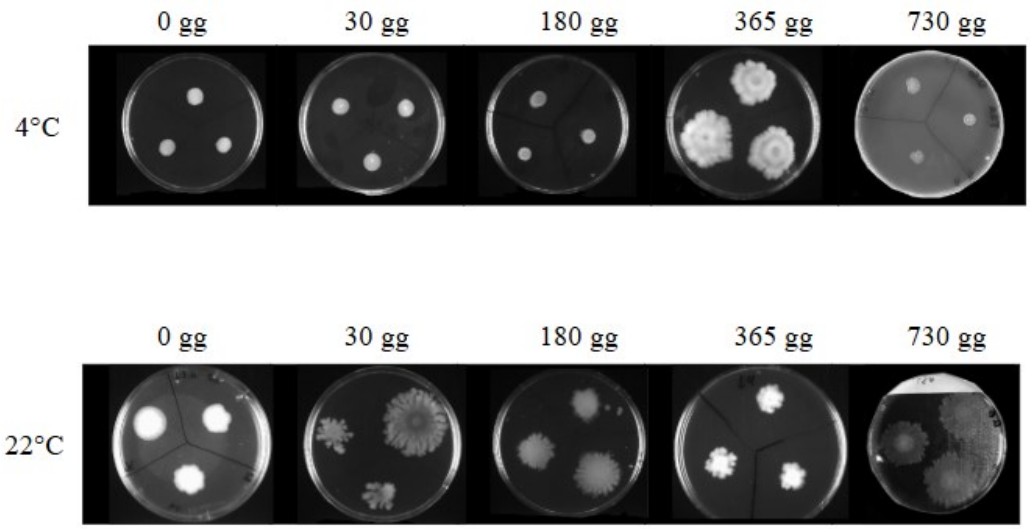

Figura 41: Analisi qualitativa della motilità swarming del ceppo P. fluorescens L3_4. Immagini rappresentative delle piastre di agar semisolido (0,6% TSA) inoculate con colture evolute a 4°C (riga superiore) e 22°C (riga inferiore) a diversi intervalli di tempo (gg = giorni).

L'analisi quantitativa dell'area di diffusione ha permesso di caratterizzare numericamente i complessi andamenti della motilità *swarming* del ceppo L3_4 (Figura 42).

Per il ceppo incubato a 4°C (linea blu), i dati confermano l'attivazione tardiva e transitoria della motilità. L'area media di diffusione si è mantenuta su valori molto bassi (< 1.5 cm²) per i primi 180 giorni. Successivamente, si è registrato un picco isolato e marcato al giorno 365, con un'area media di 5,93 cm². Tale fenotipo è risultato instabile, poiché a 730 giorni la motilità è stata nuovamente soppressa, con un'area media scesa a soli 0,42 cm². Come riportato in Tabella 16 nell'Allegato 9, l'elevata deviazione standard in alcuni punti temporali, in particolare a 0 e 365 giorni, suggerisce una forte eterogeneità fenotipica all'interno della popolazione.

Per il ceppo incubato a 22°C (linea arancione), i dati quantitativi mostrano una tendenza generale di acquisizione e potenziamento della motilità nel corso del tempo. Partendo da un'area media di 2,49 cm², la capacità di *swarming* è aumentata progressivamente, con un'accelerazione nella fase finale che ha portato l'area media a 5,72 cm² al giorno 730. Anche in questo caso, le ampie deviazioni standard osservate (Tabella 9) indicano che l'espressione di questo tratto è avvenuta in modo eterogeneo tra le diverse repliche.

Complessivamente, l'analisi quantitativa conferma che le due temperature hanno promosso strategie evolutive opposte: una soppressione generale della motilità a 4°C, interrotta da un breve e transitorio picco, e un'acquisizione stabile e crescente della motilità a 22°C.

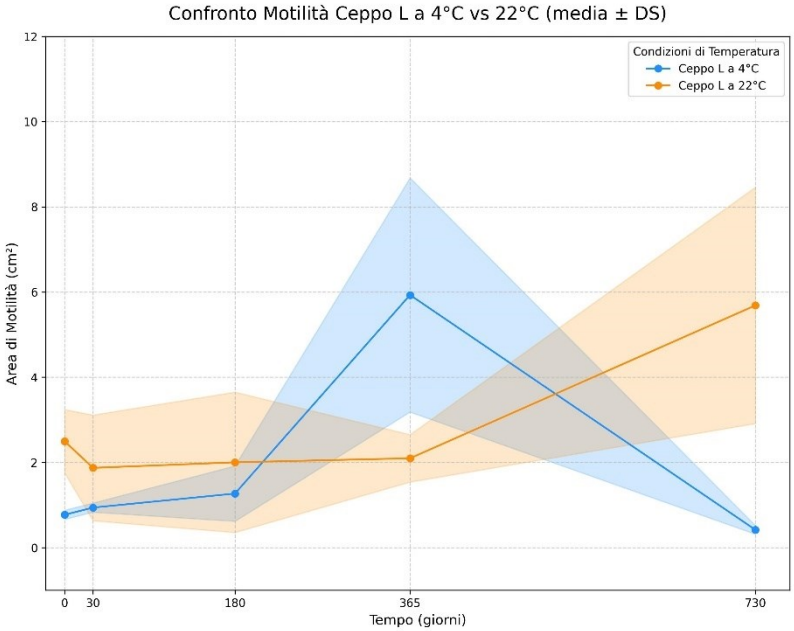

Figura 42: Evoluzione della motilità swarming del ceppo L3_4 a 4°C e 22°C. Il grafico riporta l'area media di diffusione (cm^2 ± DS) misurata a diversi intervalli di tempo

- **Ceppo uk1**

Infine, è stata analizzata l'evoluzione della motilità *swarming* per l'isolato alimentare uk1 (Figura 43). Anche in questo caso, le due temperature hanno selezionato percorsi evolutivi diametralmente opposti.

A 4°C (riga superiore), il ceppo uk1 ha mostrato un'acquisizione tardiva della motilità. Partendo da un fenotipo completamente non-motile che si è mantenuto per i primi 180 giorni, il ceppo ha iniziato a mostrare una moderata capacità di diffusione superficiale a partire dal giorno 365. Questa motilità acquisita è stata poi mantenuta e potenziata fino al termine dell'esperimento.

A 22°C (riga inferiore), si è verificato il fenomeno inverso: una perdita progressiva e completa della motilità. Il ceppo ancestrale, che al tempo zero si presentava come molto motile, ha mostrato una graduale riduzione della sua capacità di *swarming* nei punti temporali successivi. Dal giorno 180 in poi, il ceppo si è stabilizzato su un fenotipo non-motile, con la crescita confinata a piccole colonie circoscritte.

In sintesi, la pressione selettiva ha agito in modo opposto su questo tratto: le condizioni di refrigerazione a 4°C hanno promosso una lenta acquisizione della motilità *swarming*, mentre la temperatura di 22°C ne ha causato la completa soppressione.

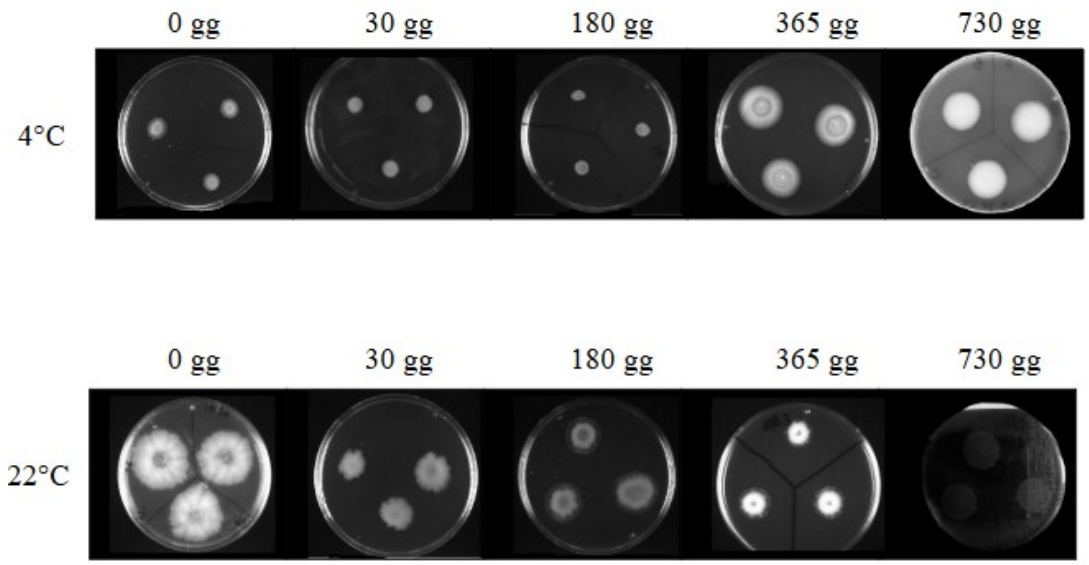

Figura 43: Analisi qualitativa della motilità swarming del ceppo P. fluorescens uk1. Immagini rappresentative delle piastre di agar semisolido (0,6% TSA) inoculate con colture evolute a 4°C (riga superiore) e 22°C (riga inferiore) a diversi intervalli di tempo (gg = giorni).

L'analisi quantitativa dell'area di diffusione ha fornito una misura numerica dei percorsi evolutivi della motilità *swarming* per il ceppo uk1 (Figura 44). Per il ceppo incubato a 4°C (linea blu), i dati hanno confermato un fenotipo di acquisizione tardiva della motilità. L'area media di diffusione si è mantenuta su valori molto bassi (media < 1 cm^2) per i primi 180 giorni. Successivamente, è stato registrato un aumento significativo, con un picco di 3,26 cm^2 al giorno 365, e mantenendosi su un valore elevato (2,30 cm^2) fino al termine dell'esperimento. La bassa deviazione standard nella fase iniziale (Tabella 10) indica che il fenotipo non-motile era stabile e omogeneo.

Per il ceppo incubato a 22°C (linea arancione), i dati quantitativi descrivono una perdita di motilità iniziale drastica, seguita da un recupero parziale ed eterogeneo. Partendo da un'elevata motilità media di 8,86 cm^2 al tempo zero, l'area di diffusione è crollata a soli 1,19 cm^2 a 30 giorni. Nei punti temporali successivi, si è osservato un lento e graduale recupero, fino a un'area media finale di 4,52 cm^2. L'analisi delle deviazioni standard (Tabella 17, Allegato 10) è particolarmente informativa: la bassissima DS al giorno 30 indica una perdita di motilità sincrona, mentre le elevate DS nei tempi successivi suggeriscono che il recupero della motilità è avvenuto in modo non uniforme, generando una popolazione fenotipicamente eterogenea.

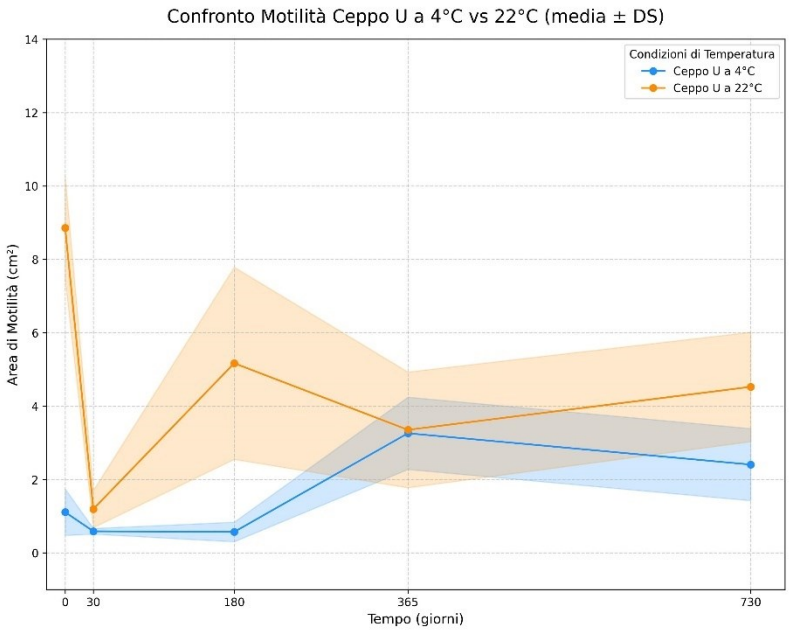

Figura 44: Evoluzione della motilità swarming del ceppo uk1 a 4°C e 22°C. Il grafico riporta l'area media di diffusione (cm^2 ± DS) misurata a diversi intervalli di tempo

Per fornire una visione d'insieme dell'evoluzione della motilità *swarming* in condizioni di refrigerazione, i dati dei tre ceppi sono stati confrontati in un unico grafico (Figura 45). L'analisi comparativa evidenzia l'esistenza di strategie fenotipiche distinte, sia in termini di intensità che di tempistica della risposta.

Il ceppo di riferimento CECT (Gruppo C, arancione) si è dimostrato il più motile, con una risposta precoce e intensa. Ha mantenuto una notevole capacità di *swarming* per gran parte dell'esperimento, raggiungendo il picco di diffusione (media 8,83 cm²) già al giorno 180.

Al contrario, entrambi gli isolati di origine alimentare hanno mostrato un fenotipo di attivazione tardiva della motilità, rimanendo sostanzialmente non-motili per i primi 180 giorni. Tuttavia, il loro comportamento successivo diverge: il ceppo L3_4 (Gruppo L, blu) ha esibito una risposta tardiva e transitoria, con un picco di motilità isolato al giorno 365 (media 5,93 cm²), seguito da una completa perdita della stessa. Invece, il ceppo uk1 (Gruppo U, viola) ha mostrato una risposta tardiva e più persistente. La sua motilità, attivata dopo 180 giorni, ha raggiunto un picco più modesto (media 3,26 cm²) al giorno 365, ma, a differenza del ceppo L3_4, è stata mantenuta a un livello significativo fino al termine dell'esperimento.

Complessivamente, i dati a 4°C indicano che il ceppo di riferimento possiede una capacità di *swarming* intrinsecamente più elevata e reattiva. Gli isolati alimentari, invece, sembrano attivare questo tratto solo in risposta a uno stress prolungato, ma con dinamiche (transitorie o persistenti) specifiche per ciascun ceppo.

L'analisi comparativa della motilità *swarming* a 22°C (Figura 45) ha rivelato strategie evolutive altrettanto divergenti, ma con trend generali opposti a quelli osservati a 4°C.

Il ceppo di riferimento **CECT 378** (Gruppo C, arancione) ha mostrato una perdita di motilità rapida e quasi totale. Già a partire dal giorno 30, la sua capacità di *swarming* è diminuita a livelli trascurabili, un fenotipo non-motile che si è mantenuto stabile per i successivi due anni.

Al contrario, il ceppo **L3_4** (Gruppo L, blu) ha esibito un fenotipo di acquisizione progressiva della motilità. Partendo da un livello moderato, ha mostrato un trend generale crescente, diventando il ceppo più motile al termine dell'esperimento, con un'area media di diffusione di 5,72 cm².

Il ceppo **uk1** (Gruppo U, viola), pur partendo da uno stato ancestrale iper-motile (media 8,78 cm²), ha subito una drastica perdita di motilità iniziale, seguita da un parziale recupero e stabilizzazione su un livello intermedio, con un'area media finale di 4,46 cm².

Complessivamente, i dati a 22°C indicano una forte pressione selettiva contro la motilità *swarming* nel ceppo di riferimento. Al contrario, per gli isolati di origine alimentare, questo tratto sembra essere vantaggioso, venendo mantenuto o acquisito nel corso dell'evoluzione a lungo termine, sebbene con dinamiche ceppo-specifiche.

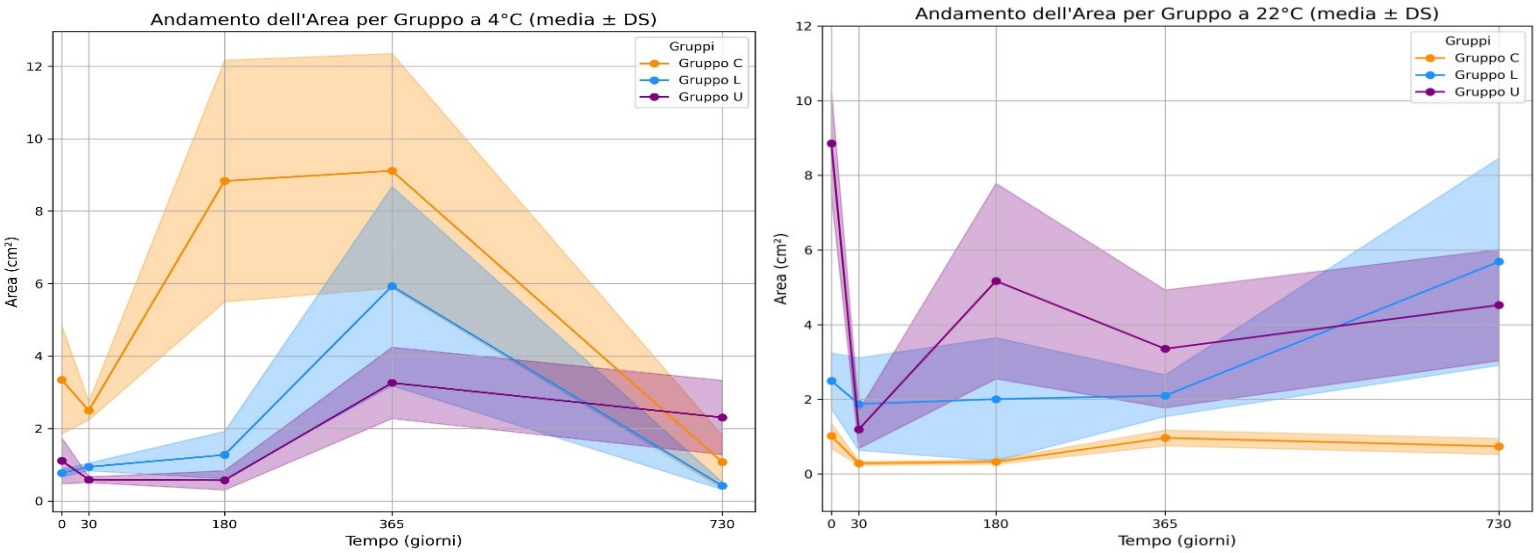

Figura 45: Confronto dell'evoluzione della motilità swarming per i ceppi CECT 378 (Gruppo C), L3_4 (Gruppo L) e uk1 (Gruppo U) incubati a 4°C. Il grafico mostra l'andamento dell'area media di diffusione (cm^2 ± DS) nel corso di 730 giorni.

I nostri risultati sulla motilità *swimming* e *swarming* sono un esempio di evoluzione divergente, in cui la temperatura di incubazione ha guidato i percorsi adattativi in direzioni opposte. La quasi totale soppressione della motilità osservata a 22°C in ceppi come il CECT 378 è un fenomeno che può essere interpretato come un compromesso adattativo. In un ambiente statico e con risorse esaurite come la *Long-Term Stationary Phase* (LTSP), la produzione e il funzionamento dell'apparato flagellare rappresentano un notevole costo energetico

(MacLean et al., 2004). Si ha quindi l'emergere di mutanti non-motili che, disattivando questo processo dispendioso, possono utilizzare le risorse energetiche verso la sopravvivenza e la manutenzione cellulare. Questo tipo di adattamento, che privilegia l'efficienza a scapito di un tratto non più utile, è stato ampiamente documentato in esperimenti di evoluzione a lungo termine (Lenski et al., 1991). Al contrario, il mantenimento o addirittura il potenziamento della motilità a 4°C suggerisce che, in condizioni di stress da freddo, i benefici della motilità superano i suoi costi. A basse temperature, il metabolismo è intrinsecamente rallentato e la capacità di esplorare attivamente il microambiente potrebbe conferire un vantaggio decisivo per accedere ai nutrienti rilasciati localmente dalla lisi cellulare o per sfuggire ad accumuli di cataboliti tossici. A livello molecolare, la perdita di motilità in fase stazionaria è un processo finemente regolato. È noto che in *E. coli*, la carenza di nutrienti porta a un aumento del secondo messaggero ciclico di-GMP (c-di-GMP), che, legandosi al complesso motore flagellare, agisce come un 'freno molecolare' riducendo la velocità di nuoto (Boehm et al., 2010). Le mutazioni che portano a una perdita di motilità permanente, come quelle che abbiamo probabilmente selezionato, potrebbero quindi fissare questo stato di 'freno' in modo costitutivo. Infine, l'eterogeneità osservata tra i ceppi (ad esempio, il CECT 378 perde la motilità mentre L3_4 la acquisisce a 22°C) riflette l'elevata plasticità fenotipica di *P. fluorescens* e dimostra che, sebbene le pressioni selettive siano le stesse, le soluzioni evolutive possono variare a seconda del *background* genetico di partenza. Questo è in linea con studi che mostrano come l'evoluzione in ambienti complessi possa portare a diversi esiti adattativi, anche quando le condizioni sono controllate (Giraud et al., 2001; Katz et al., 2021).

4.4. SEQUENZIAMENTO DELLE COLONIE

Per investigare le basi genetiche dei cambiamenti fenotipici osservati, quali le diverse strategie di sopravvivenza e i profili di motilità, è stato eseguito il sequenziamento dell'intero genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS) di colonie isolate a diversi punti temporali (30 giorni e 180 giorni) da ciascuna coltura mantenuta a 22°C o a 4°C.

L'analisi delle mutazioni accumulate nel tempo ha lo scopo di correlare le alterazioni a livello del DNA con gli adattamenti fenotipici documentati nei capitoli precedenti.

Prima di procedere con l'analisi delle mutazioni, è stata eseguita una rigorosa valutazione della qualità dei dati a diversi stadi del processo: dalla preparazione delle librerie genomiche, al sequenziamento delle *reads* (raw reads), fino all'assemblaggio finale dei genomi. I risultati di questi controlli di qualità sono riportati nel paragrafo seguente.

I dati riportati di seguito provengono da analisi di dati ottenuti in precedenza in quanto i genomi dei cloni ai tempi 365 giorni e 730 giorni (librerie da me preparate) non sono stati ottenuti in tempo per essere analizzati e presentati in questa tesi.

4.4.1. VALUTAZIONE QUALITA' DEL SEQUENZIAMENTO

Le librerie genomiche per il sequenziamento WGS sono state preparate a partire da singoli cloni come descritto in dettaglio nel capitolo Materiali e Metodi (paragrafo 3.4.5.3.). La qualità di ciascuna libreria è stata preliminarmente verificata tramite l'analizzatore *Agilent Bioanalyzer*. I risultati hanno mostrato profili elettroforetici di alta qualità, caratterizzati da una distribuzione dei frammenti nel range atteso di 250-1000 bp, con un picco principale ben definito e assenza di contaminanti quali dimeri di primer o adattatori, come illustrato nell'esempio rappresentativo in Figura 46.

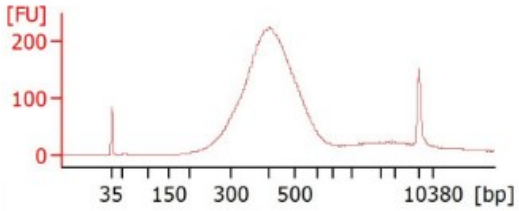

Figura 46: Esempio profilo Bioanalyzer HS

Successivamente al sequenziamento, è stato ottenuto un totale di 1,790,459,480 *reads* grezze (raw reads). La qualità di queste sequenze è stata ispezionata utilizzando il software FastQC. L'analisi ha confermato l'elevata qualità dei dati, con punteggi *Phred score* quasi sempre al di sopra della soglia di accettabilità (Q > 30) per la maggior parte della lunghezza delle *reads*, come evidenziato dal grafico di qualità per base in Figura 47.

Figura 47: FastQC Report di sequenze Forward e Reverse

Dopo la fase di *trimming* per rimuovere le sequenze a bassa qualità e gli adattatori, sono state ottenute 1,778,421,852 *reads* di alta qualità, che sono state utilizzate per l'assemblaggio *de novo* dei genomi tramite il software SPAdes. La qualità finale degli assemblaggi è stata valutata con QUAST. Come riportato in Tabella 18 (Allegato 11), i principali parametri, quali il numero di *contig* e il valore di N50 ed L50, indicano un assemblaggio di buona qualità, frammentato in un numero ridotto di sequenze lunghe.

Infine, per confermare l'identità e l'integrità filogenetica dei cloni sequenziati, è stato costruito un albero filogenetico (Figura 48). L'analisi filogenetica ha rivelato una topologia ad albero con tre cladi monofiletici nettamente separati, ciascuno corrispondente a uno dei tre ceppi utilizzati nell'esperimento. Come atteso, tutti i cloni evoluti si sono raggruppati esclusivamente con il loro rispettivo ceppo ancestrale: tutti i cloni derivati dal ceppo di riferimento (identificati dalla lettera 'C') formano un unico cluster con l'antenato CECT378 t0, tutti i cloni derivati dall'isolato L3_4 (Ps20) (identificati dalla lettera 'L') si raggruppano con l'antenato Ps20 t0 e tutti i cloni derivati dall'isolato uk1 (Ps77) (identificati dalla lettera 'U') si raggruppano con l'antenato Ps77 t0.

La notevole lunghezza dei rami che separano i tre cladi principali riflette la distanza genetica esistente tra i ceppi di partenza. Al contrario, i rami molto corti all'interno di ciascun clade indicano l'elevata similarità genetica tra i cloni evoluti e il loro progenitore. Complessivamente, questo risultato conferma l'integrità del set di dati, validando l'identità di ciascun campione sequenziato e confermando l'assenza di contaminazioni. Ciò permette di procedere con l'analisi delle mutazioni accumulate in ciascuna linea evolutiva.

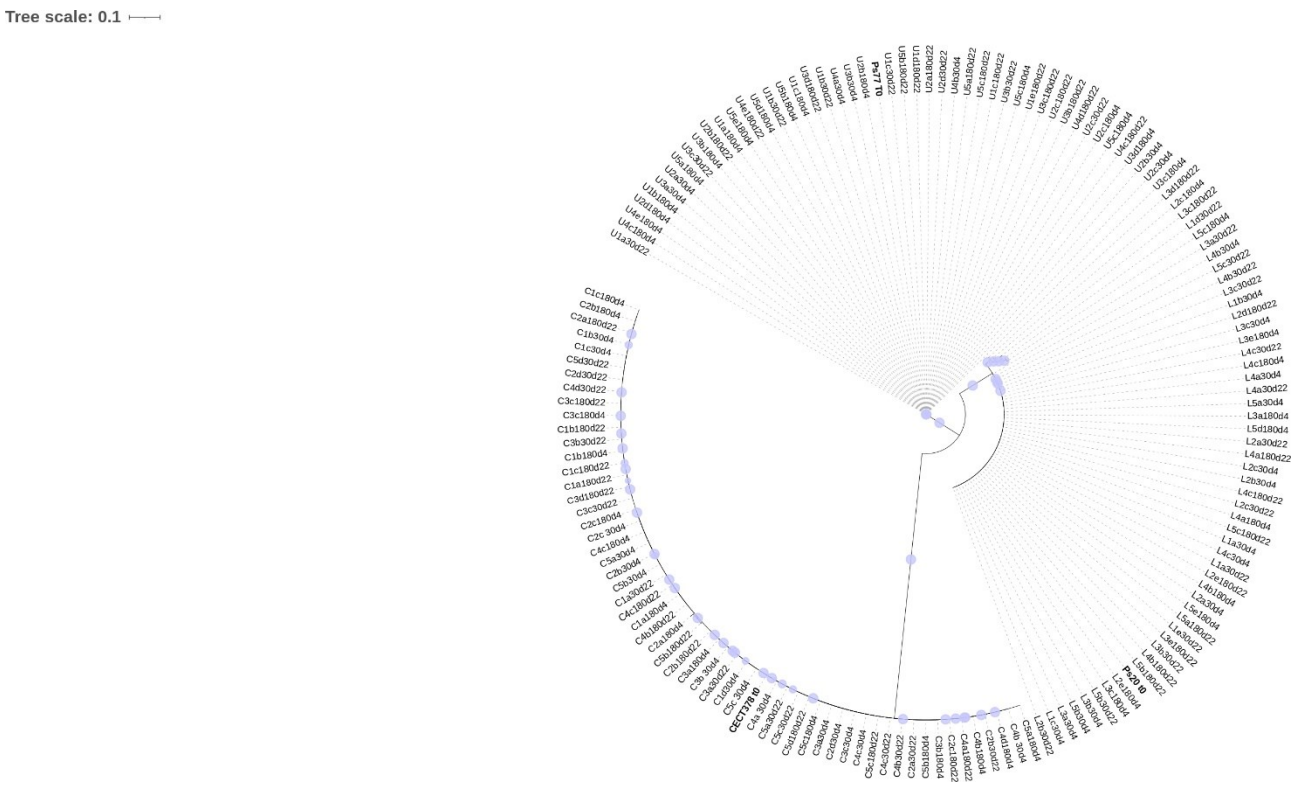

Figura 48: Albero filogenetico che mostra le relazioni tra i ceppi ancestrali (CECT378 t0, Ps20 t0, Ps77 t0) e tutti i cloni evoluti. I cloni sono etichettati in base al ceppo di origine (C: CECT, L: L3_4, U: uk1), al tempo di campionamento (es. 180d) e alla temperatura di incubazione (4 o 22). La barra di scala indica la distanza genetica (sostituzioni per sito).

4.4.2. ANALISI DELLE MUTAZIONI (BRESEQ)

L'analisi dei dati di sequenziamento ha permesso di identificare le mutazioni accumulate in ciascun clone evoluto rispetto al proprio genoma ancestrale. Per ottenere una visione d'insieme, le mutazioni sono state classificate in base alla loro localizzazione (regioni codificanti o intergeniche) e al loro potenziale effetto funzionale (mutazioni missenso, non senso, sinonime e inserzioni/delezioni - in/del). La Tabella 5 riassume il numero totale di mutazioni identificate per ciascun ceppo e condizione sperimentale, offrendo un quadro comparativo della dinamica evolutiva a livello genomico.

Tabella 5: Mutazioni trovate in seguito al sequenziamento di 180 cloni (30 e 180 giorni)

	CECT 378		L3_4 (Ps20)		uk1 (Ps77)	
	4°C	22°C	4°C	22°C	4°C	22°C
Coding	37	33	14	31	8	10
Missenso	20	18	8	23	3	6
Non senso	0	1	2	3	0	0
In/del	11	6	4	5	4	4
Sinonime	10	8	11	18	1	1
Intergeniche	28	24	31	29	10	23
Tot 30 gg	40	35	42	59	17	19
Tot 180 gg	54	47	48	48	10	26

Dall'analisi dei dati emergono differenze significative nel numero e nella tipologia di mutazioni accumulate tra i diversi ceppi e le due temperature di incubazione.
Il ceppo di riferimento CECT 378 ha accumulato il numero più elevato di mutazioni in entrambe le condizioni, con un totale di 54 mutazioni a 4°C e 47 a 22°C al giorno 180. In questo ceppo, le mutazioni non sinonime (missenso e in/del) rappresentano la frazione predominante delle alterazioni in regioni codificanti.
Il ceppo L3_4 (Ps20) mostra un comportamento fortemente dipendente dalla temperatura. A 22°C ha accumulato un numero di mutazioni considerevole (48), paragonabile a quello del ceppo CECT, con una netta prevalenza di mutazioni missenso (23). A 4°C, invece, il numero di mutazioni in regioni codificanti è risultato inferiore (14), sebbene il totale delle mutazioni intergeniche (31) sia rimasto elevato. È interessante notare come questo ceppo sia l'unico in cui sono state identificate mutazioni non senso in entrambe le condizioni.
Infine, il ceppo uk1 (Ps77) si distingue per aver accumulato un numero complessivamente inferiore di mutazioni rispetto agli altri due ceppi, specialmente a 4°C, dove sono state registrate solo 10 mutazioni totali al giorno 180. A 22°C, il numero di mutazioni è risultato maggiore (26), principalmente a causa di un aumento delle mutazioni in regioni intergeniche (23). È da sottolineare l'assenza di mutazioni non senso e il bassissimo numero di mutazioni sinonime in questo ceppo.
Complessivamente, la quantificazione delle mutazioni suggerisce che le pressioni selettive e/o i tassi di mutazione sono variati in modo ceppo-specifico e temperatura-dipendente.

Per visualizzare più chiaramente le differenze nell'accumulo di mutazioni all'interno delle regioni codificanti, è stato generato un grafico a barre che confronta il numero medio di mutazioni per ciascun ceppo, temperatura e punto temporale (Figura 49).
L'analisi evidenzia che la principale fonte di variazione nel numero di mutazioni codificanti è la diversità genetica intrinseca tra i ceppi, piuttosto che l'effetto delle condizioni sperimentali. Il Ceppo CECT 378 si distingue per aver accumulato il numero più elevato di mutazioni codificanti, con una media di circa 18-19 eventi per genoma in tutte le condizioni analizzate.
Il Ceppo L3_4 mostra un numero intermedio di mutazioni, che si mantiene notevolmente costante attorno a una media di 20 eventi.
Il Ceppo uk1 si conferma come il ceppo con la minore attività mutazionale nelle regioni codificanti, con un numero medio di mutazioni che non supera i 7 eventi per genoma.
È da notare che, per tutti e tre i ceppi, non emergono differenze statisticamente significative nel numero di mutazioni codificanti accumulate tra le due temperature (4°C e 22°C) o tra i due punti temporali (30 e 180 giorni).

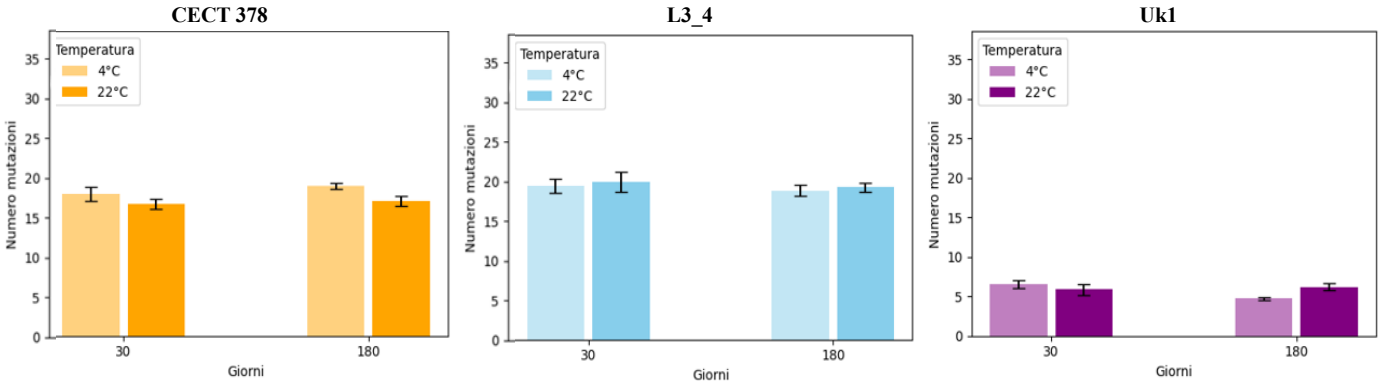

Figura 49: Confronto del numero medio (± errore standard) di mutazioni in regioni codificanti accumulate nei ceppi CECT 378, L3_4 e uk1. I dati sono presentati per i punti temporali di 30 e 180 giorni e per le temperature di incubazione di 4°C e 22°C.

Per analizzare in dettaglio i pattern di evoluzione genetica del ceppo CECT 378, è stata costruita una heatmap che visualizza la presenza di mutazioni nei 41 loci genici identificati (Figura 50). La mappa mostra ciascun gene mutato (colonne) per ogni singola popolazione replicata (righe), suddivisa per temperatura e tempo di incubazione. L'intensità del colore indica il grado di fissazione della mutazione all'interno di ciascuna popolazione, ovvero in quanti dei tre cloni sequenziati è stata rilevata (grigio chiaro: 1/3; grigio scuro: 2/3; nero: 3/3). Una descrizione dettagliata di ciascun locus genico, inclusa la posizione, la funzione annotata e il tipo di mutazione, è riportata in Allegato 12. L'analisi della heatmap rivela un elevato grado di parallelismo evolutivo, indicando che popolazioni indipendenti hanno ripetutamente acquisito mutazioni negli stessi geni. In particolare, si è osservato che un ristretto numero di loci genici è stato mutato ripetutamente in popolazioni evolute in modo indipendente, suggerendo che questi geni siano i principali bersagli della pressione selettiva in condizioni di LTSP. Tra questi, spiccano i geni 22, 23 e 24 (T1SS secreted agglutinin RTX @ RTX toxins and related Ca^{2+}-binding proteins) che appaiono mutati, spesso con un alto grado di fissazione, in quasi tutte le repliche, indipendentemente dalla temperatura o dal tempo. Anche i geni 7 (ABC transporter, ATP-binding protein (cluster 3, basic aa/glutamine/opines) e 26 (RND efflux system, inner membrane transporter) mostrano un simile pattern di mutazioni ricorrenti. Si possono osservare anche alcune differenze: ad esempio, le mutazioni nel gene 15 (Aerotaxis sensor receptor protein) sembrano essere specifiche per la condizione a 4°C, mentre altre, come quella nei geni 19 (Trk potassium uptake system protein TrkH), 20 (Inner membrane protein YfiN) e 21 (ABC transporter, permease protein), compaiono solo a 22°C.

Dal punto di vista temporale, molte delle mutazioni nei geni "bersaglio" sono già presenti a 30 giorni, indicando una selezione adattativa molto rapida. In altri casi, le mutazioni sembrano emergere o fissarsi solo al giorno 180, suggerendo dinamiche di adattamento più lente o una seconda ondata selettiva.

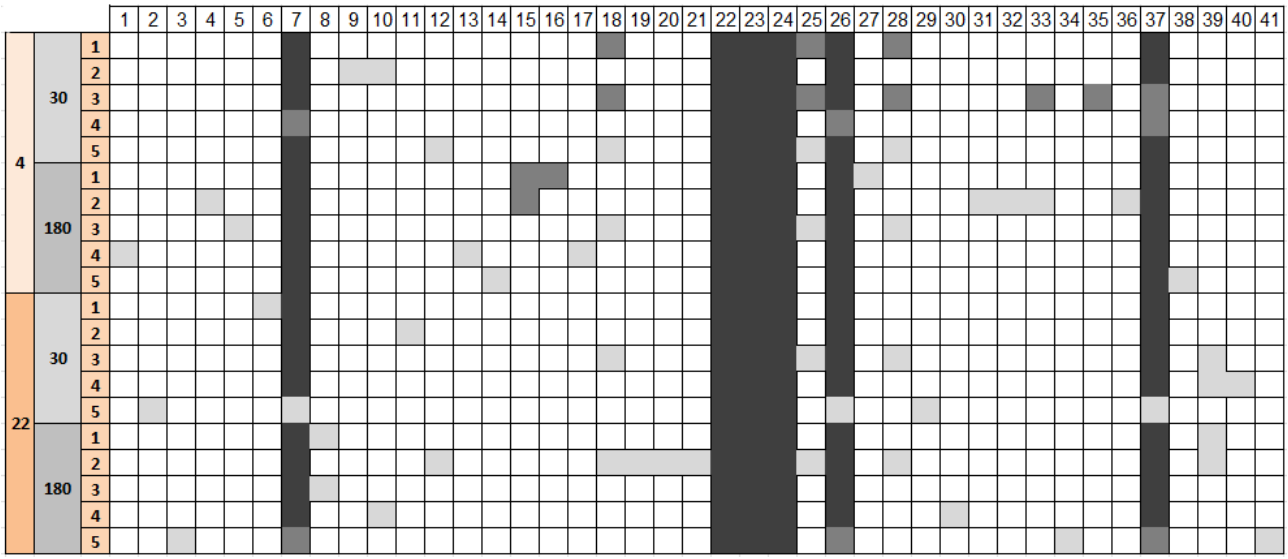

Figura 50: Heatmap delle mutazioni nel ceppo CECT 378. Le colonne rappresentano i geni mutati, le righe le popolazioni replicate. L'intensità del grigio è proporzionale al numero di cloni (da 0 a 3) con una mutazione in quel gene. Le barre laterali raggruppano le repliche per temperatura e tempo di incubazione.

Le mutazioni del ceppo L3_4, visualizzato nella heatmap di Figura 51, mostra un pattern evolutivo nettamente distinto da quello del ceppo di riferimento. L'osservazione più saliente è la drastica differenza nel numero di mutazioni accumulate tra le due temperature. Nelle popolazioni incubate a 4°C, il genoma è rimasto notevolmente stabile, con un numero molto esiguo di mutazioni sporadiche. Al contrario, a 22°C si è registrata un'attività mutazionale significativamente più elevata, come indicato dal maggior numero di celle colorate. Un'altra differenza fondamentale rispetto al ceppo CECT è la generale assenza di parallelismo evolutivo. La maggior parte delle mutazioni identificate, soprattutto a 22°C, appaiono come eventi unici per una singola popolazione. L'unica eccezione rilevante è rappresentata dal gene 43 (Leukotoxin), che si configura come l'unico bersaglio primario della selezione in questo ceppo, essendo mutato in quasi tutte le repliche a prescindere dalla condizione sperimentale. Complessivamente, la heatmap del ceppo L3_4 suggerisce un percorso evolutivo temperatura-dipendente e in gran parte stocastico. A 4°C l'evoluzione genomica è minima. A 22°C, pur essendo più attiva, non sembra convergere su un set definito di geni (ad eccezione del gene 43), indicando che diverse soluzioni genetiche potrebbero aver contribuito all'adattamento delle singole popolazioni.

Una descrizione dettagliata di ciascun locus genico, inclusa la posizione, la funzione annotata e il tipo di mutazione, è riportata in Allegato 13.

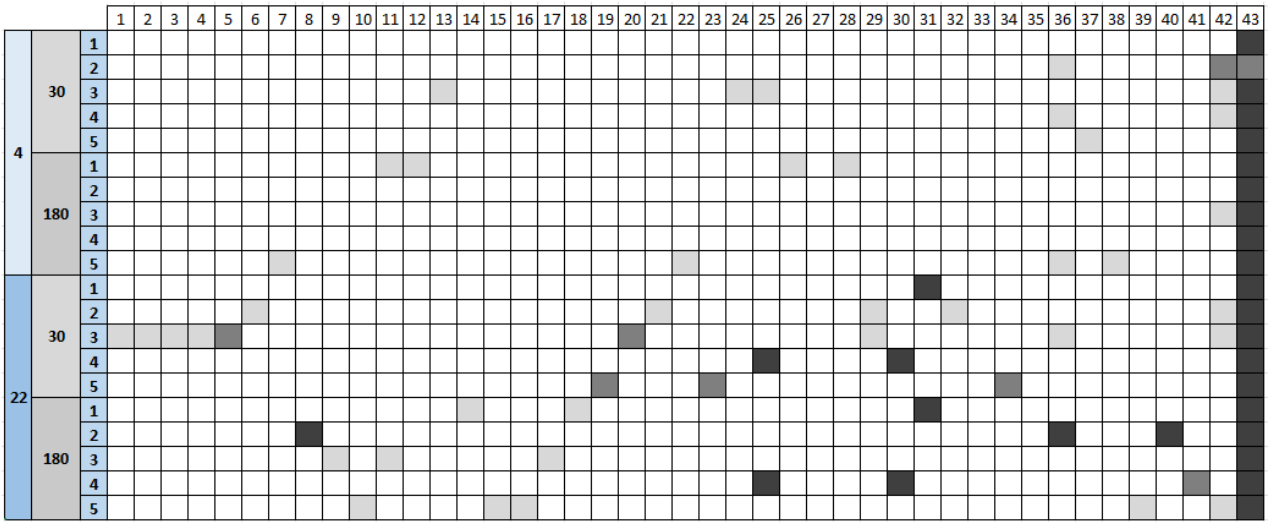

Figura 51: Heatmap delle mutazioni nel ceppo L3_4. Le colonne rappresentano i geni mutati, le righe le popolazioni replicate. L'intensità del grigio è proporzionale al numero di cloni (da 0 a 3) con una mutazione in quel gene. Le barre laterali raggruppano le repliche per temperatura e tempo di incubazione.

Le mutazioni del ceppo uk1, rappresentato in Figura 52, conferma che è il ceppo più stabile tra quelli analizzati. La heatmap è caratterizzata da un numero molto basso di eventi mutazionali complessivi. A differenza del ceppo CECT, l'evoluzione parallela è quasi del tutto assente. Non sono stati identificati dei loci genici mutati ripetutamente in popolazioni evolute in modo indipendente, e la maggior parte delle mutazioni sono eventi che compaiono in singole popolazioni replicate, indicando un percorso evolutivo largamente stocastico. Confrontando le due condizioni, il numero di mutazioni a 22°C è risultato leggermente superiore a quello registrato a 4°C, ma in entrambi i casi l'attività mutazionale è rimasta molto contenuta. L'evoluzione del ceppo uk1 in condizioni di LTSP è caratterizzata da un basso tasso di accumulo di mutazioni e da una mancanza di convergenza su specifici target genetici. Questo suggerisce che l'adattamento di questo ceppo potrebbe basarsi su meccanismi regolatori o fenotipici piuttosto che su un'ampia riprogrammazione genetica, oppure che il suo genoma ancestrale fosse già ben adattato alle condizioni di stress imposte.

Una descrizione dettagliata di ciascun locus genico, inclusa la posizione, la funzione annotata e il tipo di mutazione, è riportata in Allegato 14.

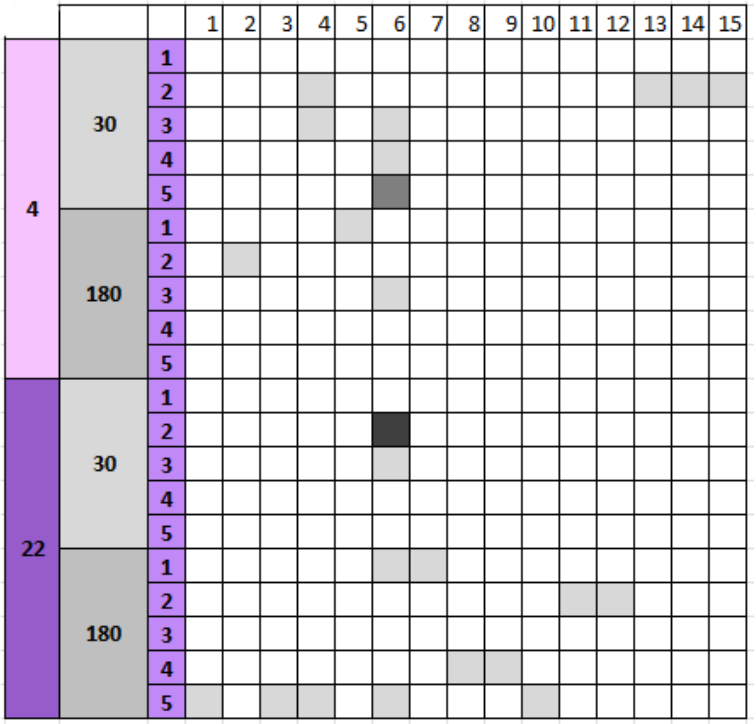

Figura 52: Heatmap delle mutazioni nel ceppo uk1. Le colonne rappresentano i geni mutati, le righe le popolazioni replicate. L'intensità del grigio è proporzionale al numero di cloni (da 0 a 3) con una mutazione in quel gene. Le barre laterali raggruppano le repliche per temperatura e tempo di incubazione.

L'analisi comparativa dei tre ceppi di *P. fluorescens* rivela strategie evolutive genomiche diverse che riflettono la loro differente origine e il loro adattamento alle condizioni di stress. Il ceppo di riferimento **CECT 378** ha seguito un percorso di evoluzione largamente parallela e convergente. L'adattamento di questo ceppo è stato guidato dalla selezione positiva su un set ristretto di geni mutati ripetutamente in quasi tutte le popolazioni indipendenti, indipendentemente dalla temperatura. Questo suggerisce un percorso adattativo prevedibile e incanalato verso soluzioni genetiche ben definite. Al contrario, il ceppo di origine alimentare **L3_4** ha mostrato un'evoluzione fortemente condizionata dalla temperatura e in gran parte stocastica. A 4°C, il suo genoma è rimasto notevolmente stabile, mentre a 22°C ha accumulato un numero significativamente maggiore di mutazioni. Tuttavia, a differenza del ceppo CECT, queste mutazioni non sono convergenti, ma rappresentano per lo più eventi distinti e unici per ogni popolazione. Infine, il ceppo **uk1**, anch'esso di origine alimentare, si è distinto per la sua elevata stabilità genomica e un'evoluzione quasi puramente stocastica. Ha accumulato il minor numero di mutazioni in assoluto e non ha mostrato alcun segnale significativo di parallelismo evolutivo.

Per comprendere le conseguenze funzionali delle alterazioni genetiche identificate, i geni mutati in ciascun ceppo sono stati classificati in categorie funzionali. I dati di Gene Ontology (GO) sono stati desunti da un confronto dei geni su PubMed e UniProt. La Figura 53 riassume i risultati, mostrando il numero di geni mutati all'interno delle principali categorie per ciascuno dei tre ceppi. L'analisi funzionale rivela profili di mutazione nettamente divergenti, indicando che ciascun ceppo ha intrapreso un percorso adattativo distinto a livello molecolare. Il ceppo di riferimento CECT 378 mostra un arricchimento predominante di mutazioni in geni appartenenti alle categorie "protein metabolism_transport_secretion" e "Motility and Chemotaxis". Questo risultato si correla fortemente con i fenotipi di motilità alterata osservati e suggerisce che l'adattamento di questo ceppo sia stato guidato principalmente dalla modifica delle sue interazioni con l'ambiente e delle sue capacità di movimento. Il ceppo L3_4, al contrario, presenta il suo arricchimento più marcato e quasi esclusivo nella categoria "Signaling and Regulation". L'accumulo di un numero così elevato di mutazioni in geni regolatori indica una forte pressione selettiva verso una riprogrammazione globale dei circuiti di segnalazione come principale strategia adattativa. Infine, il ceppo uk1, pur confermando il suo ridotto carico mutazionale, si distingue per essere l'unico ceppo a presentare una mutazione in un gene direttamente associato alla categoria "Persistence". Questo dato è di particolare interesse alla luce dei fenotipi di persistenza osservati e suggerisce un meccanismo di adattamento unico e specifico per questo isolato. Complessivamente, questa analisi funzionale rafforza l'osservazione che non esiste un'unica strategia genetica di adattamento alla LTSP. I tre ceppi, sottoposti alle medesime pressioni ambientali, hanno risposto evolvendo attraverso la modifica di percorsi biologici differenti: il ceppo CECT 378 ha modificato principalmente le sue funzioni di trasporto, secrezione e motilità, il ceppo L3_4 ha modificato la sua regolazione, mentre il ceppo uk1 ha mostrato un'evoluzione caratterizzata da un numero molto limitato di alterazioni genetiche.

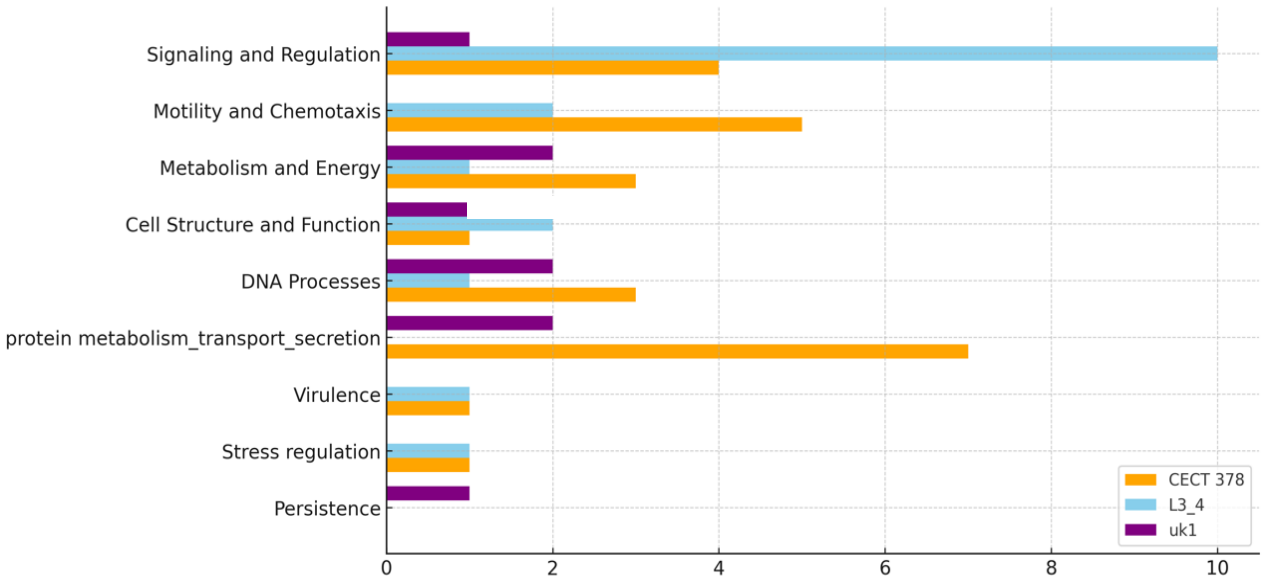

Figura 53: Classificazione funzionale dei geni mutati. Il grafico a barre mostra il numero di geni mutati per ciascuna categoria funzionale (asse y) nei tre ceppi analizzati (CECT 378, L3_4, uk1).

L'analisi genomica dei cloni evoluti nel corso di due anni ha svelato dinamiche evolutive complesse e ceppo-specifiche, in linea con i recenti studi sull'evoluzione batterica in fase stazionaria a lungo termine (LTSP). È emerso chiaramente che la LTSP non è uno stato di dormienza passiva, ma un ambiente altamente selettivo in cui le popolazioni batteriche continuano ad adattarsi geneticamente attraverso l'accumulo di mutazioni (Katz et al., 2021; Zion et al., 2024). Un tema centrale che emerge dai nostri dati, in particolare per il ceppo di riferimento CECT 378, è il notevole grado di evoluzione parallela. L'aver identificato ripetutamente mutazioni negli stessi loci genici in repliche biologiche indipendenti è una forte evidenza che queste alterazioni genetiche sono adattative e guidate da una marcata selezione positiva (Avrani et al., 2017). Questo fenomeno suggerisce che, per un dato background genetico, esistono specifiche "soluzioni" per ottimizzare la sopravvivenza in condizioni di carenza di nutrienti. Nel nostro esperimento, i principali bersagli di questa evoluzione convergente sono stati i geni codificanti per sistemi di trasporto e secrezione. In particolare, per il ceppo CECT 378, le mutazioni ricorrenti nel sistema di secrezione di tipo I (T1SS) e nelle tossine della famiglia RTX rappresentano un risultato di grande interesse. I T1SS sono macchinari molecolari complessi che esportano grandi proteine coinvolte nell'adesione e nelle interazioni cellula-cellula (Smith et al.,2018). In un ambiente statico come la LTSP in beuta, queste funzioni potrebbero essere non solo superflue, ma anche energeticamente costose, e le mutazioni osservate potrebbero quindi rappresentare una strategia adattativa per ridurre questo dispendio metabolico. Un percorso evolutivo distinto è stato osservato nel ceppo di origine alimentare L3_4, che ha mostrato una frequenza di mutazioni particolarmente elevata nel gene della leucotossina. Essendo le leucotossine fattori di virulenza cruciali il cui bersaglio sono i leucociti del sistema immunitario (Srikumaran et al., 2020), il loro mantenimento in un ambiente di laboratorio privo di pressione selettiva immunitaria è probabilmente svantaggioso. L'inattivazione di questo gene rappresenta quindi un classico esempio di pleiotropia antagonistica, dove la perdita di una funzione costosa in un ambiente in cui non è più necessaria conferisce un vantaggio selettivo (MacLean et al., 2004). In netto contrasto con gli altri due ceppi, uk1 ha mostrato una notevole stabilità genomica, accumulando un numero significativamente inferiore di mutazioni. Questo fenotipo unico può essere collegato alla sua capacità di produrre un pigmento con proprietà antiossidanti (Andreani et al., 2019). Poiché la LTSP è un ambiente caratterizzato da un elevato stress ossidativo che può aumentare il tasso di mutazione (McDougald et al., 2002), la protezione offerta dal pigmento potrebbe ridurre il danno al DNA, spiegando la stabilità genomica osservata. Questa resilienza intrinseca potrebbe anche indicare che il ceppo uk1 era già relativamente ben adattato alle condizioni di stress, riducendo la pressione selettiva per l'acquisizione di nuove mutazioni. Complessivamente, i nostri dati genomici mostrano come ceppi diversi della stessa specie trovino soluzioni evolutive differenti per lo stesso problema. Il ceppo di riferimento CECT 378 si adatta riprogrammando le sue interazioni con l'ambiente attraverso i sistemi di secrezione; il ceppo alimentare L3_4 si adatta disattivando una funzione non essenziale in queste condizioni, come i fattori di virulenza; e il ceppo pigmentato uk1 sembra fare affidamento sulla sua resilienza biochimica intrinseca, limitando la necessità di cambiamenti genetici. Questi percorsi divergenti sottolineano come l'origine e la storia evolutiva di un ceppo ne influenzino profondamente le strategie adattative future.

5. DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi si è posto l'obiettivo di investigare le strategie adattative, a livello fenotipico e genetico, di tre ceppi di *Pseudomonas fluorescens* durante una prolungata esposizione a condizioni di carenza di nutrienti (*Long-Term Stationary Phase*, LTSP) a due diverse temperature (4°C e 22°C). I risultati ottenuti hanno rivelato una notevole plasticità fenotipica e genotipica, fortemente influenzata sia dalla temperatura di incubazione sia dal *background* genetico di ciascun ceppo, dimostrando che non esiste un'unica strategia di sopravvivenza per questa specie. A 4°C, la formazione di cellule *persisters* è emersa come un meccanismo di sopravvivenza a lungo termine per alcuni ceppi, mentre a 22°C la dinamica si è spostata verso la gestione delle popolazioni VBNC o si è basata sulla capacità di sopravvivenza delle cellule coltivabili. Analogamente, la motilità ha seguito percorsi evolutivi divergenti, venendo generalmente potenziata a basse temperature e soppressa a temperatura ambiente. L'analisi genomica ha fornito una base molecolare a queste osservazioni, evidenziando come ceppi diversi raggiungano l'adattamento attraverso bersagli genetici differenti: dalla riprogrammazione dei sistemi di secrezione (CECT 378), alla perdita selettiva di fattori di virulenza (L3_4), fino a una notevole stabilità genomica (uk1), probabilmente mediata da meccanismi di protezione dei pigmenti. Complessivamente, questo studio dimostra che l'adattamento in LTSP è un processo complesso e multifattoriale, che va ben oltre il concetto di semplice dormienza. I nostri risultati si inseriscono nel modello dell'evoluzione in fase stazionaria come un processo dinamico di competizione, morte e riciclo di nutrienti, che guida una rapida selezione di mutanti più adatti (Finkel, 2006; Katz et al., 2021). La divergenza nei percorsi evolutivi tra ceppi di riferimento e isolati alimentari suggerisce che la storia selettiva pregressa di un ceppo ne influenza profondamente le future modalità di adattamento. Nonostante l'ampiezza dei dati raccolti, questo studio apre la strada a numerose prospettive future. In primo luogo, l'estensione del monitoraggio a tempi ancora più lunghi permetterà di verificare se le traiettorie evolutive osservate si stabilizzeranno o continueranno a divergere. In secondo luogo, un'analisi trascrittomica (RNA-seq) dei cloni evoluti sarà fondamentale per comprendere le conseguenze funzionali delle mutazioni identificate. Questo permetterà di correlare un cambiamento genetico a una specifica alterazione nell'espressione genica, chiarendo il ruolo adattativo delle mutazioni nei sistemi di secrezione o nella leucotossina e il loro impatto sul fenotipo. Infine, sarebbe interessante testare la fitness di questi cloni evoluti in contesti più applicativi, come matrici alimentari reali o in co-coltura con altre specie microbiche, per validare la rilevanza delle strategie osservate *in vitro*. In conclusione, questo lavoro fornisce una visione dettagliata sulla resilienza e la capacità adattativa di *P. fluorescens*, un importante e versatile agente alterativo dell'industria alimentare. La dimostrazione che questo batterio non solo sopravvive, ma si evolve attivamente anche a temperature di refrigerazione, ha implicazioni dirette per la sicurezza e la qualità degli alimenti. Comprendere i meccanismi genetici e fenotipici della sua persistenza è un passo fondamnetale per sviluppare strategie di controllo e sanificazione più efficaci.

ALLEGATO 1

Tabella 6: Dati relativi alle conte di cellule coltivabili, VBNC e persisters del ceppo CECT 378 a 4 °C

CECT 378 a 4°C				
Log cells per mL				
Giorni	Qpcr ± DS	CFU ± DS	VBNC ± DS	Persisters ± DS
0	10,35 ± 0,53	6,69 ± 1,11	1,77 ± 0,63	0 ± 0,00
15	10,42 ± 1,50	8,53 ± 0,69	2,36 ± 1,50	0 ± 0,00
30	8,75 ± 0,48	7,91 ± 0,30	1,10 ± 0,46	2,80 ± 0,12
90	9,99 ± 0,29	7,99 ± 0,14	2,12 ± 0,26	3,7 ± 0,04
120	10,24 ± 0,06	7,76 ± 0,90	1,65 ± 0,14	4,67 ± 0,55
180	9,36 ± 0,46	8,27 ± 0,09	1,09 ± 0,40	3,82 ± 0,19
365	9,58 ± 0,14	7,99 ± 0,32	1,58 ± 0,31	5,83 ± 1,54
545	9,59 ± 0,20	8,46 ± 0,26	1,13 ± 0,34	5,57 ± 0,62
730	8,11 ± 0,60	7,63 ± 0,33	0,48 ± 0,28	6,18 ± 0,96

ALLEGATO 2

Tabella 7: Dati relativi alle conte di cellule coltivabili, VBNC e persisters del ceppo CECT 378 a 22 °C

CECT 378 a 22°C				
Log cells per mL				
Giorni	Qpcr ± DS	CFU ± DS	VBNC ± DS	Persisters ± DS
0	10,34 ± 0,52	4,75 ± 0,53	5,59 ± 0,6	0,00 ± 0
15	10,60 ± 0,31	6,34 ± 0,06	4,47 ± 0,37	1,19 ± 1,78
30	8,64 ± 0,27	7,38 ± 0,13	1,46 ± 0,31	3,72 ± 1,08
90	8,77 ± 0,16	7,26 ± 0,15	1,51 ± 0,27	4,14 ± 0,96
120	9,54 ± 0,35	7,98 ± 0,38	1,56 ± 0,43	2,62 ± 1,4
180	8,85 ± 1,16	7,14 ± 0,21	1,71 ± 1,16	3,51 ± 0,87
365	8,94 ± 0,64	6,94 ± 0,06	2,00 ± 0,53	3,74 ± 0,24
545	9,13 ± 1,08	7,83 ± 0,54	1,11 ± 1,21	3,64 ± 0,13
730	6,4 ± 0,31	6,66 ± 0,31	0 ± 0,51	3,68 ± 0,64

ALLEGATO 3

Tabella 8: Dati relativi alle conte di cellule coltivabili, VBNC e persisters del ceppo L3_4 a 4 °C

L3_4 a 4°C				
Log cells per mL				
Giorni	Qpcr ± DS	CFU ± DS	VBNC ± DS	Persisters ± DS
0	10,55 ± 0,24	8,51 ± 0,82	2,41 ± 0,26	0 ± 0,00
15	9,71 ± 0,70	10,24 ± 0,34	0,04 ± 0,08	0 ± 0,00
30	8,93 ± 0,64	8,23 ± 0,12	0,68 ± 0,52	0 ± 0,00
90	8,18 ± 0,53	8,08 ± 0,22	0,22 ± 0,28	0,31 ± 0,70
120	7,76 ± 0,28	7,33 ± 3,45	0 ± 0,00	0,8 ± 1,12
180	7,73 ± 0,40	8,25 ± 0,14	0,05 ± 0,12	0 ± 0,00
365	8,12 ± 0,46	8,03 ± 0,12	0,21 ± 0,28	2,27 ± 0,38
545	8,09 ± 0,20	8,37 ± 0,26	0,08 ± 0,18	0 ± 0,00
730	6,24 ± 0,54	7,45 ± 0,11	0 ± 0,00	3,73 ± 0,34

ALLEGATO 4

Tabella 9: Dati relativi alle conte di cellule coltivabili, VBNC e persisters del ceppo L3_4 a 22 °C

L3_4 a 22°C				
Log cells per mL				
Giorni	Qpcr ± DS	CFU ± DS	VBNC ± DS	Persisters ± DS
0	10 ± 0,34	8,55 ± 0,06	1,45 ± 0,39	0,19 ± 0,43
15	10,53 ± 0,64	9,56 ± 0,85	1,15 ± 0,69	1,32 ± 0,33
30	9,78 ± 0,42	8,33 ± 0,10	1,45 ± 0,50	1,4 ± 1,31
90	9,71 ± 0,48	8,06 ± 0,35	1,33 ± 0,47	2,44 ± 0,27
120	7,49 ± 0,11	8,53 ± 0,19	0 ± 0,00	2,24 ± 0,60
180	7,92 ± 0,94	7,98 ± 0,63	0,41 ± 0,68	0,78 ± 1,07
365	7,66 ± 0,36	7,09 ± 0,09	0,57 ± 0,38	0,62 ± 1,39
545	7,51 ± 0,14	8,17 ± 0,13	0 ± 0,00	0 ± 0,00
730	6,58 ± 0,37	6,69 ± 0,57	0,25 ± 0,25	0,62 ± 1,39

ALLEGATO 5

Tabella 10: Dati relativi alle conte di cellule coltivabili, VBNC e persisters del ceppo uk1 a 4 °C

uk1 a 4°C				
Log cells per mL				
Giorni	Qpcr ± DS	CFU ± DS	VBNC ± DS	Persisters ± DS
0	9,64 ± 0,65	4,90 ± 2,01	4,15 ± 0,65	0 ± 0,00
15	9,73 ± 0,91	7,75 ± 0,37	1,70 ± 0,91	0 ± 0,00
30	9,06 ± 0,16	6,35 ± 1,52	4,15 ± 0,26	0 ± 0,00
90	10,05 ± 0,21	6,99 ± 1,26	4,25 ± 0,26	1,01 ± 0,92
120	10,27 ± 0,07	7,83 ± 0,67	1,89 ± 0,08	0,64 ± 0,59
180	8,33 ± 0,22	7,76 ± 0,08	0,57 ± 0,14	0,69 ± 1,08
365	8,19 ± 0,32	7,78 ± 0,12	0,41 ± 0,21	2,70 ± 0,20
545	8,15 ± 0,33	8,13 ± 0,22	0,21 ± 0,34	3,15 ± 0,08
730	6,77 ± 0,31	7,02 ± 0,27	0,08 ± 0,19	3,28 ± 0,26

ALLEGATO 6

Tabella 11: Dati relativi alle conte di cellule coltivabili, VBNC e persisters del ceppo uk1 a 22 °C

uk1 a 22°C				
Log cells per mL				
Giorni	Qpcr ± DS	CFU ± DS	VBNC ± DS	Persisters ± DS
0	9,78 ± 0,84	5,49 ± 2,62	4,29 ± 0,84	0 ± 0,00
15	10,51 ± 0,30	7,94 ± 0,47	3,01 ± 0,31	0 ± 0,00
30	8,39 ± 0,30	7,96 ± 0,04	0,43 ± 0,30	0 ± 0,00
90	8,25 ± 0,49	7,58 ± 0,18	0,6 ± 0,57	0 ± 0,00
120	9,70 ± 0,07	7,65 ± 0,54	1,54 ± 0,18	0,39 ± 0,88
180	7,24 ± 0,29	6,98 ± 0,47	0,31 ± 0,29	0 ± 0,00
365	8,53 ± 1,15	6,73 ± 0,13	1,80 ± 1,07	0 ± 0,00
545	7,40 ± 0,16	7,90 ± 0,12	0 ± 0,00	0 ± 0,00
730	6,43 ± 0,32	6,87 ± 0,26	0,01 ± 0,03	0 ± 0,00

ALLEGATO 7

Tabella 12: Valori medi aree test swimming ceppo CECT 378 a 4°C e 22°C

Valori medi aree swimming CECT 378		
Tempo (gg)	Area (cm2) a 4°C ± DS	Area (cm2) a 22°C ± DS
0	1,36 ± 0,37	2,51 ± 0,77
30	17,88 ± 9,67	1,04 ± 0,25
180	13,27 ± 8,92	0,86 ± 0,10
365	52,80 ± 1,05	1,72 ± 0,95
730	6,85 ± 4,47	1,55 ± 0,69

Tabella 13: Valori medi aree test swimming ceppo L3_4 a 4°C e 22°C

Valori medi aree swimming L3_4		
Tempo (gg)	Area (cm2) a 4°C ± DS	Area (cm2) a 22°C ± DS
0	4,96 ± 4,09	18,37 ± 4,48
30	7,14 ± 3,21	22,29 ± 6,97
180	33,50 ± 26,48	40,78 ± 22,88
365	53,36 ± 1,15	6,97 ± 3,78
730	4,17 ± 4,79	10,54 ± 5,27

Tabella 14: Valori medi aree test swimming ceppo uk1 a 4°C e 22°C

Valori medi aree swimming uk1		
Tempo (gg)	Area (cm2) a 4°C ± DS	Area (cm2) a 22°C ± DS
0	40,39 ± 17,26	22,81 ± 5,13
30	20,94 ± 11,58	22,23 ± 2,21
180	4,89 ± 5,73	48,33 ± 6,25
365	51,43 ± 2,99	0,84 ± 0,17
730	16,21 ± 10,17	3,92 ± 1,33

ALLEGATO 8

Tabella 15: Valori medi aree test swarming ceppo CECT 378 a 4°C e 22°C

Valori medi aree swarming CECT 378		
Tempo (gg)	Area (cm2) a 4°C ± DS	Area (cm2) a 22°C ± DS
0	3,35 ± 1,22	1,02 ± 0,33
30	2,49 ± 0,17	0,28 ± 0,04
180	8,83 ± 2,89	0,33 ± 0,04
365	9,11 ± 3,14	0,97 ± 0,21
730	1,07 ± 0,73	0,74 ± 0,20

ALLEGATO 9

Tabella 16: Valori medi aree test swarming ceppo L3_4 a 4°C e 22°C

Valori medi aree swarming L3_4		
Tempo (gg)	Area (cm2) a 4°C ± DS	Area (cm2) a 22°C ± DS
0	3,62 ± 6,38	2,50 ± 0,63
30	0,94 ± 0,07	1,87 ± 0,66
180	1,27 ± 0,54	2,00 ± 1,65
365	5,93 ± 2,71	2,10 ± 0,53
730	0,42 ± 0,06	5,69 ± 2,88

ALLEGATO 10

Tabella 17: Valori medi aree test swarming ceppo uk1 a 4°C e 22°C

Valori medi aree swarming uk1		
Tempo (gg)	Area (cm2) a 4°C ± DS	Area (cm2) a 22°C ± DS
0	1,11 ± 0,67	8,86 ± 1,34
30	0,59 ± 0,08	1,19 ± 0,35
180	0,57 ± 0,25	5,17 ± 2,74
365	3,26 ± 0,77	3,35 ± 1,48
730	2,31 ± 1,07	4,52 ± 1,48

ALLEGATO 11

Tabella 18: Tabella QUAST con parametri assemblaggio

Assembly	Contigs	Largest contig	Total length	GC (%)	N50	N75	L50	L75	N's per 100 kbp
10	75	550410	6118904	5991	363220	134115	8	14	2613
11	79	537795	6119930	5991	231840	172136	10	17	3560
12	88	578073	6119611	5992	219936	113132	10	19	3226
13	67	720317	6119363	5991	226641	150072	9	16	3053
30_	93	516646	6141051	6026	208116	116206	9	18	3571
31	103	686552	6146041	6027	171990	93472	11	23	3597
32_	98	940813	6145409	6026	165186	104160	10	22	3324
33	86	748444	6137868	6026	175627	103161	9	19	2563
34	110	815619	6149143	6025	165397	103161	11	22	3093
35	100	748265	6141538	6026	163036	94235	10	22	3320
36_	95	686131	6142515	6027	159671	109420	11	22	3220
37_	113	495419	6142788	6025	168631	93497	13	25	3191
38_	126	355855	6149544	6026	160176	95049	14	27	3477
39_	92	516520	6141546	6027	182884	113268	11	22	3131
4	102	360875	6119710	5990	141286	66888	14	30	2615
40_	98	436097	6141062	6027	193226	95034	11	23	2635
41_	142	554186	6147842	6026	128104	73299	16	32	4188
42_	127	443238	6141415	6027	146082	81509	14	29	2615
43_	102	885574	6139928	6026	168472	81164	11	24	2406
44	305	151340	6120157	5989	34802	21834	51	106	1920
45	61	517489	6125089	5993	240125	146749	9	16	3709
46	57	483052	6123747	5992	236445	134273	10	18	2941
47	388	131772	6126528	5987	32682	17175	59	122	1804
48	78	444472	6122000	5993	213248	116298	10	21	2890
49	71	713270	6123119	5992	237388	129032	9	18	3518
5	113	391014	6116804	5990	118375	58502	16	36	2774
50	72	508184	6125800	5993	197193	89824	11	21	3542
6	83	391476	6120212	5990	197002	80366	11	24	3095
7	81	607484	6468639	6004	281938	152051	9	17	2273
8	77	1068902	6121358	5991	231768	162326	7	15	3558
9	71	650065	6120012	5992	224065	129078	10	18	3627
C1a180d22	120	573251	6476701	6001	165876	96065	11	23	1552
C1a180d4	90	561403	6466183	6004	220274	145633	9	19	1833
C1a30d22_	100	607314	6466992	6003	183939	113445	10	21	1803
C1b180d22	95	640490	6468155	6003	199524	120413	11	21	2330
C1b180d4	96	545745	6468736	6003	220502	116125	10	19	1489
C1b_30d4	106	339567	6473164	6007	165762	87765	14	28	2268
C1c180d22	108	344302	6467952	6004	158148	110115	14	26	2061
C1c180d4	102	607496	6472474	6003	165876	103994	12	24	2418
C1c_30d4	91	450931	6471167	6005	233577	108671	10	20	1776
C1d_30d4	105	575540	6470361	6004	216520	133871	9	17	2120

C2a180d22	111	639789	6471102	6002	172769	114303	11	21	2010
C2a180d4_b	67	188107	3651623	6003	98839	54785	14	26	1621
C2a30d22_	110	561800	6468391	6003	144801	94129	14	28	1575
C2b180d22	212	561377	6512541	5995	173447	99515	11	23	1677
C2b180d4	103	561288	6471202	6003	162897	87686	12	26	2655
C2b30d22_	84	781814	6466250	6003	245495	142885	8	17	1533
C2b_30d4	88	725139	6466502	6005	216517	120975	9	19	1404
C2c180d22	87	727115	6466996	6003	177077	108783	11	23	2304
C2c180d4	127	607995	6476330	6003	159032	92453	11	25	2528
C2c_30d4	112	349962	6469713	6006	165876	94166	13	26	1505
C2d30d22_	106	617045	6470613	6003	186693	93865	10	22	2139
C2d_30d4	148	561289	6483721	6003	143438	79946	12	27	1624
C3a180d4	207	607471	6501690	5997	165876	94131	12	25	2713
C3a30d22_	86	606917	6466151	6003	186724	110773	11	23	1519
C3a_30d4	78	801122	6465786	6004	329581	186599	7	14	1356
C3b180d4	108	561455	6472400	6005	165876	87790	13	25	2588
C3b1y4_	92	573228	6468072	6003	189409	114128	11	22	2474
C3b30d22_	101	661163	6466920	6003	174163	120692	9	19	1845
C3b_30d4	87	573073	6466428	6005	184854	135562	10	20	1707
C3c180d22	89	668302	6470709	6004	182479	127009	12	23	1926
C3c180d4	115	607690	6472315	6004	143400	84806	13	27	2141
C3c30d22_	110	561352	6466299	6003	163044	104089	12	24	1808
C3c_30d4	98	592451	6468184	6006	165876	93832	11	24	1534
C3d180d22	73	1090087	6473133	6002	494937	169238	5	11	1520
C3e180d22	87	1064512	6135825	6026	246189	132732	8	16	2753
C4a180d22	145	561579	6481863	6005	156107	94358	14	27	2232
C4a_30d4	108	607484	6471662	6006	216533	104038	10	22	2301
C4b180d22	83	607366	6467064	6003	269940	157782	9	17	1846
C4b180d4	111	561378	6471396	6004	160881	93836	13	26	1250
C4b30d22_	90	607225	6468071	6003	186704	123024	11	22	2127
C4b_30d4	99	677141	6469303	6006	186852	95058	10	21	1677
C4c180d22	77	607402	6466719	6004	211568	152036	9	19	2132
C4c180d4	123	687711	6477570	6001	220178	123267	9	19	2339
C4c30d22_	88	561327	6467421	6003	173394	109721	11	22	2012
C4c_30d4	92	706845	6465663	6005	284108	128757	8	16	1197
C4d180d4	102	561629	6469674	6005	165835	92457	11	25	2046
C4d30d22_	89	607396	6466443	6003	177079	114459	11	22	1996
C5a180d4	109	339651	6471896	6004	159062	87718	13	27	2078
C5a30d22_	106	560629	6465896	6003	159195	92192	11	25	1502
C5a_30d4	80	573260	6470551	6005	196057	126543	9	20	2232
C5b180d22_b	278	164263	4748523	5987	42294	17473	33	75	3911
C5b180d4	98	573228	6470317	6004	186802	94357	10	22	2405
C5b_30d4	91	611990	6470258	6004	325179	129004	7	15	1969
C5c180d22	93	411387	6469038	6005	178405	116399	13	24	2343
C5c180d4	93	607361	6470695	6003	186704	110123	10	22	2570

C5c30d22_	84	561390	6465021	6004	216511	151128	9	18	1731
C5c_30d4	105	561271	6469376	6006	159923	104069	12	24	2005
C5d180d22	96	749879	6468692	6004	188143	114303	9	20	2144
C5d30d22_	92	607125	6466610	6004	172754	103983	9	21	1897
CECT378_t0	94	677179	6469590	6005	189322	98638	10	21	1373
L1a1y4_	96	748390	6138211	6027	223995	94938	8	19	3020
L1a30d22_	114	582171	6143989	6024	140527	69683	15	30	2918
L1b1y4_	93	549759	6139305	6026	198864	91052	10	22	3533
L1d30d22_b	31	174921	1283684	5997	58982	38100	8	15	1761
L1e30d22_	128	438189	6145029	6025	116439	61206	17	34	2923
L2a1y4_	123	885517	6143978	6022	159678	93344	11	24	2751
L2a30d22_	122	748254	6136986	6026	126717	64644	15	31	2596
L2b1y4_	91	597183	6137492	6026	184311	96347	10	22	2949
L2b30d22_	118	453525	6134807	6025	138497	72411	15	29	2528
L2c180d4_b	14	97800	496815	6009	40586	31957	4	7	2013
L2c30d22_	107	694481	6135539	6026	145544	84147	12	26	2901
L2d180d22	116	383233	6134919	6026	152800	95553	14	26	1581
L2e180d22	177	383405	6149426	6022	145229	72949	14	30	1790
L2e180d4	106	397543	6140150	6026	151690	93528	12	24	3264
L3a180d4	122	642831	6145123	6024	169182	91931	10	23	2955
L3a30d22_	116	500624	6139865	6026	145563	66566	14	29	3036
L3b30d22_	110	821281	6136543	6026	146469	85400	12	25	2865
L3c180d22_b	1688	41662	3347891	6017	2359	1418	331	797	1732
L3c180d4	109	665866	6140307	6025	152904	84460	12	26	3159
L3c30d22_	110	790709	6138580	6026	151334	91688	13	25	2818
L3d180d22_b	420	59530	3718833	6017	16395	8605	70	150	4429
L3e180d22	109	559815	6136903	6025	182625	100994	11	21	1602
L3e180d4	111	573562	6139405	6026	145606	84283	13	27	2868
L4a180d22	122	449529	6141274	6024	183002	90880	10	22	2263
L4a180d4	107	408927	6144643	6027	200438	77681	10	23	3771
L4a30d22_	104	397242	6134245	6026	145680	83450	14	27	2396
L4b180d22	92	748250	6136989	6026	205302	99012	9	20	2865
L4b180d4	104	549913	6140158	6026	151246	93350	14	27	3370
L4b30d22_	105	850188	6137236	6026	140527	60938	14	29	2941
L4c180d22	104	748095	6135562	6025	159773	104166	11	23	3015
L4c180d4	121	438408	6142130	6026	125703	64637	16	31	3085
L4c30d22_	119	351514	6136603	6026	151680	61203	15	30	2493
L5a180d22	90	1028393	6139118	6026	180030	115559	8	18	2981
L5b180d22	99	863319	6140546	6026	180149	96186	10	21	3371
L5b30d22_	109	495308	6136311	6026	155799	96382	14	27	2620
L5c180d22	95	408867	6137612	6026	170350	90882	12	24	2744
L5c180d4_b	21	238648	1069031	6010	86651	50436	4	9	2002
L5c30d22_	106	606932	6135490	6026	131814	73317	14	29	2844
L5d180d4	109	506582	6140241	6026	151014	81526	13	26	3179
L5e180d4	223	748381	6178015	6020	220648	95003	9	18	2653

Ps20_t0	12	3719696	5866234	6027	3719696	1031191	1	2	24636
Ps77_T0	66	1283648	6116378	5991	293252	139027	6	14	2492
U1a180d4	98	498218	6120533	5991	144808	77683	14	28	3390
U1a30d22_	99	326526	6118992	5991	154246	77688	14	28	3247
U1b180d4	110	391448	6119824	5991	140702	61187	13	29	3350
U1b30d221_	98	425637	6117598	5990	141269	78486	13	27	3295
U1b30d22_	104	353886	6118103	5990	144800	64939	15	29	3158
U1c180d22	107	425811	6116379	5990	133528	80103	17	32	3237
U1c180d4	114	383178	6119154	5991	128941	53939	16	35	3510
U1c30d22_	90	383191	6118455	5990	167283	97280	13	24	3489
U1d180d22	88	437431	6116090	5990	184119	97303	10	21	2856
U1e180d22	103	341547	6116880	5990	140642	70407	15	30	2657
U2a180d22	109	392041	6118415	5990	142465	83918	13	27	2718
U2b180d22	186	201971	6115158	5990	59947	33405	30	64	2701
U2b180d4_b	66	305624	4535547	5999	134115	63431	12	24	3186
U2c180d22	93	405342	6118079	5990	179602	91744	12	24	3545
U2c180d4	95	383014	6122661	5992	172372	86598	13	25	3848
U2c30d22	115	354733	6119173	5990	129477	60546	15	33	3567
U2d180d4	114	326525	6118980	5991	132294	72927	16	31	2935
U2d30d22	108	383101	6118210	5990	129483	71568	14	29	2823
U3b180d22	115	360912	6122934	5990	110093	57126	17	36	3328
U3b180d4	116	344764	6119808	5991	122995	70550	16	33	2479
U3b30d22	96	426386	6118304	5990	134336	73191	14	30	3529
U3c180d22	72	838627	6119187	5991	293094	148120	7	15	3244
U3c180d4	107	425749	6120865	5990	130303	85030	14	30	3103
U3c30d22	98	361025	6121160	5991	171926	72785	12	27	3491
U3d180d22	93	383138	6160076	5989	189750	91379	12	25	3260
U3d180d4	111	391287	6122950	5989	140620	77692	14	29	3232
U4c180d22	114	354891	6118360	5990	125991	61032	16	33	3638
U4c180d4	181	410939	6142155	5986	146367	69005	13	29	3297
U4d180d22	82	517076	6115888	5991	209022	97286	9	19	3424
U4e180d22	115	405355	6123285	5989	144810	91443	12	24	3358
U4e180d4	103	383176	6116554	5991	140306	64888	15	31	3352
U5a180d22	79	383144	6117378	5991	234331	115577	10	20	3323
U5b180d22	79	1264279	6116567	5991	236333	119894	6	15	3701
U5c180d22	83	557186	6116432	5991	184761	100425	10	20	3275
U5c180d4	102	360875	6119710	5990	141286	66888	14	30	2615
U5d180d4	113	391014	6116804	5990	118375	58502	16	36	2774
U5e180d4	83	391476	6120212	5990	197002	80366	11	24	3095
c1a1y4_	87	607229	6468042	6003	199007	116260	9	19	2316
c1b1y4_	111	561351	6469729	6003	151784	81570	13	27	2498
c3a1y4_	103	341525	6116223	5990	144389	73243	13	27	3257
u1a1y4_	97	498468	6119096	5992	141900	87300	14	27	3564
u1b1y4_	95	363739	6120840	5992	197619	85168	12	23	3415
u2a1y4_	102	360791	6120691	5991	144094	83848	13	27	3310

u2b1y4_	97	366220	6116751	5990	150039	82028	12	26	2696

ALLEGATO 12

Tabella 19: Descrizione dei geni mutati e del tipo di mutazioni nel ceppo CECT 378

	Gene	Posizione	Descrizione	Mutazione	Tipo
1	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	132,947	Two-component system sensor histidine kinase	C→A	Missenso
2	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	50,72	Murein hydrolase activator NlpD	C→T	Nonsenso
3	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	5,824	Arginine pathway regulatory protein ArgR, repressor of arg regulon	C→T	Missenso
4	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	52,629	Chemotaxis protein methyltransferase CheR (EC 2.1.1.80)	Δ1 bp	Delezione
5	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	53,016	Chemotaxis protein methyltransferase CheR (EC 2.1.1.80)	+G	Inserzione
6	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	89,197	DNA polymerase III delta prime subunit (EC 2.7.7.7)	G→T	Missenso
7	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	29,368	ABC transporter, ATP-binding protein (cluster 3, basic aa/glutamine/opines)	C→T	Missenso
8	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	92,997	2-polyprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase	T→C	Missenso
9	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	244,443	T6SS AAA+ chaperone ClpV (TssH)	A→C	Missenso
10	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	258,591	Chorismate--pyruvate lyase (EC 4.1.3.40)	G→C	Missenso
11	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	71,372	Sensory box/GGDEF family protein	Δ18 bp	Delezione
12	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	14,969	Deoxyribodipyrimidine photolyase (EC 4.1.99.3)	C→T	Missenso
13	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	114,295	Aerotaxis sensor receptor protein	C→A	Missenso

14	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	115,126	Aerotaxis sensor receptor protein	C→T	Missenso
15	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	115,45	Aerotaxis sensor receptor protein	Δ1 bp	Delezione
16	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	260,522	Flagellar motor switch protein FliG	$(GCGTGG)_{2 \rightarrow 1}$	Delezione
17	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	4,212	LysR family transcriptional regulator PA0133	G→T	Missenso
18	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	26,158	Isoleucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.5)	A→G	Missenso
19	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	22,64	Trk potassium uptake system protein TrkH	C→G	Missenso
20	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	371,672	Inner membrane protein YfiN	G→A	Missenso
21	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	20,764	ABC transporter, permease protein (cluster 3, basic aa/glutamine/opines)	A→T	Missenso
22	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	2,205	T1SS secreted agglutinin RTX @ RTX toxins and related Ca2+-binding proteins	2 bp→AAG	Delezione
23	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	2,212	T1SS secreted agglutinin RTX @ RTX toxins and related Ca2+-binding proteins	Δ1 bp	Delezione
24	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	2,216	T1SS secreted agglutinin RTX @ RTX toxins and related Ca2+-binding proteins	2 bp→AC	Delezione
25	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	29,519	Conjugative transfer ATP-dependent DNA helicase	G→A	Missenso
26	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	166,668	RND efflux system, inner membrane transporter	A→G	Missenso
27	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	2,82	hypothetical protein	G→T	Missenso

28	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	13,682	MCP methyltransferase, CheR-type	T→C	Missenso
29	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	146,948	hypothetical protein	T→C	Missenso
30	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	147,06	hypothetical protein	+T	Inserzione
31	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	80	hypothetical protein	A→C	Missenso
32	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	82	hypothetical protein	T→G	Missenso
33	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	87	hypothetical protein	A→T	Missenso
34	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	43,84	Multidrug efflux system EmrAB-OMF, inner-membrane proton/drug antiporter EmrB (MFS type)	T→C	Missenso
35	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	121,773	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain J (EC 1.6.5.3)	C→G	Missenso
36	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	52,22	Aerobic cobaltochelatase CobN subunit (EC 6.6.1.2)	C→T	Missenso
37	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	186,406	hypothetical protein	A→C	Missenso
38	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	193,412	T6SS component TssM (IcmF/VasK)	C→T	Missenso
39	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	158,011	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase CheB (EC 3.1.1.61)	Δ12 bp	Delezione
40	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	158,447	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase CheB (EC 3.1.1.61)	G→A	Missenso
41	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	158,867	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase CheB (EC 3.1.1.61)	C→T	Missenso

ALLEGATO 13

Tabella 20: Descrizione dei geni mutati e del tipo di mutazioni nel ceppo L3_4

	Gene	Posizione	Descrizione	Mutazione	Tipo
1	*PFLL34_00258* →	200	Transposase DDE domain protein	C→A	Missenso
2	*PFLL34_00258* →	248	Transposase DDE domain protein	2 bp→CC	Inserzione
3	*PFLL34_00258* →	321	Transposase DDE domain protein	G→A	Missenso
4	*PFLL34_00258* →	323	Transposase DDE domain protein	C→T	Missenso
5	*uvrY* ←	13,858	Response regulator UvrY	Δ16 bp	Delezione
6	*uvrY* ←	13,914	Response regulator UvrY	A→G	Missenso
7	*uvrY* ←	14,053	Response regulator UvrY	G→A	Nonsense (introduzione codone di stop)
8	*bvgS_2* ←	295,662	Virulence sensor protein BvgS precursor	C→A	Missenso
9	*bvgS_2* ←	295,71	Virulence sensor protein BvgS precursor	A→C	Missenso
10	*bvgS_2* ←	295,78	Virulence sensor protein BvgS precursor	A→C	Missenso
11	*PFLL34_00598* →	368,015	Bacterial extracellular solute-binding protein, family 3	T→G	Missenso
12	*PFLL34_01213* ←	1,032,864	hypothetical protein	C→G	Missenso
13	*PFLL34_01316* →	1,129,973	hypothetical protein	$(CTG)_{4\rightarrow3}$	Delezione
14	*rpoA* →	1,292,034	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	A→G	Missenso
15	*rpoA* →	1,292,035	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	C→A	Missenso
16	*rpoA* →	1,292,037	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	G→T	Missenso
17	*rpoA* →	1,292,154	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	A→T	Missenso
18	*PFLL34_01934* ←	1,796,192	hypothetical protein	G→A	Missenso

19	*aguA* →	2,367,936	Agmatine deiminase	C→T	Missenso
20	*motA* →	2,647,792	Motility protein A	A→G	Missenso
21	*psaB* ←	3,325,584	Photosystem I	+CG	Inserzione
22	*rpoS* ←	3,450,044	RNA polymerase sigma factor RpoS	$(TTC)_{3\rightarrow2}$	Delezione
23	*nlpD* ←	3,450,662	Murein hydrolase activator NlpD precursor	G→A	Nonsense (introduzione codone di stop)
24	*nhaA_1* →	3,507,690	Na(+)/H(+) antiporter NhaA	G→A	Missenso
25	*PFLL34_03506* →	3,575,297	LemA family protein	G→A	Nonsense (introduzione codone di stop)
26	*barA_3* →	219,87	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	T→C	Missenso
27	*barA_3* →	219,888	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	G→A	Missenso
28	*barA_3* →	220,075	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	Δ21 bp	Delezione
29	*barA_3* →	220,554	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	G→C	Missenso
30	*barA_3* →	220,568	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	A→G	Missenso
31	*barA_3* →	220,569	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	C→G	Missenso
32	*barA_3* →	220,607	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	C→T	Nonsense (introduzione codone di stop)
33	*barA_3* →	220,923	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	C→A	Missenso
34	*barA_3* →	221,117	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	Δ18 bp	Delezione
35	*barA_3* →	221,93	Signal transduction histidine-protein kinase BarA	C→T	Nonsense (introduzione codone di stop)
36	*PFLL34_04599* ←	579,105	hypothetical protein	C→T	Missenso

37	*pip_2* ←	901,164	Proline iminopeptidase	$(G)_{6\rightarrow7}$	Inserzione
38	*tmk_3* ←	158,904	Thymidylate kinase	T→A	Missenso
39	*yjiR_5* ←	223,344	putative HTH-type transcriptional regulator YjiR	A→G	Missenso
40	*yjiR_5* ←	224,666	putative HTH-type transcriptional regulator YjiR	+C	Inserzione
41	*nphR* ←	231,535	Transcriptional activator NphR	C→A	Missenso
42	*lktA* →	574	Leukotoxin	T→C	Missenso
43	*lktA* →	1,024	Leukotoxin	G→C	Missenso

ALLEGATO 14

Tabella 21: Descrizione dei geni mutati e del tipo di mutazioni nel ceppo uk1

	Gene	Posizione	Descrizione	Mutazione	Tipo
1	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	44,009	hypothetical protein	C→T	Missenso
2	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* →	112,975	hypothetical protein	+78 bp	Inserzione
3	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	586,947	RNA polymerase sigma factor RpoS	Δ3 bp	Delezione
4	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* ←	4,86	hypothetical protein	77 bp→CTT	Inserzione
5	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	28,691	Transcriptional activator of acetoin dehydrogenase operon AcoR	G→T	Delezione
6	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org* →	488,502	hypothetical protein	98 bp→9 bp	Inserzione
7	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	38,216	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	T→C	Missenso
8	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	40,874	Single-stranded DNA-binding protein	G→T	Missenso
9	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* →	40,877	Single-stranded DNA-binding protein	C→T	Missenso
10	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	341,524	Two-component sensor CbrA: intrcellular carbon:nitrogen balance	G→A	Missenso
11	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2* ←	342,131	Two-component sensor CbrA: intrcellular carbon:nitrogen balance	G→A	Missenso

12	*rasttk_feature_annotation_tool=annotate_proteins_km er_v2 →*	51,229	Long-chain fatty acid transport protein	+C	Inserzione
13	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org →*	139,442	hypothetical protein	A→C	Missenso
14	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org →*	139,444	hypothetical protein	T→C	Missenso
15	*rasttk_feature_annotation_tool=lisacarraro@patricbr c.org →*	139,448	hypothetical protein	C→T	Missenso

BIBLIOGRAFIA

Abee, T., Koomen, J., Metselaar, K., Zwietering, M., & Besten, H. D. (2016). Impact of pathogen population heterogeneity and Stress-Resistant variants on food safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, *7*(1), 439–456. https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033128

Andreani, N. A. (2016). *Into the blue: Spoilage phenotypes of Pseudomonas fluorescens in food matrices* [Tesi di dottorato, Università degli Studi di Padova]. Archivio istituzionale dell'Università degli Studi di Padova. https://hdl.handle.net/11577/3424342

Andreani, N. A., Carraro, L., Martino, M. E., Fondi, M., Fasolato, L., Miotto, G., Magro, M., Vianello, F., & Cardazzo, B. (2015). A genomic and transcriptomic approach to investigate the blue pigment phenotype in Pseudomonas fluorescens. *International Journal of Food Microbiology*, *213*, 88–98. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.024

Andreani, N. A., Carraro, L., Zhang, L., Vos, M., & Cardazzo, B. (2019). Transposon mutagenesis in Pseudomonas fluorescens reveals genes involved in blue pigment production and antioxidant protection. *Food Microbiology*, *82*, 497–503. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.028

Andreani, N. A., Martino, M. E., Fasolato, L., Carraro, L., Montemurro, F., Mioni, R., Bordin, P., Cardazzo, B. (2014). Tracking the blue: A MLST approach to characterise the *Pseudomonas fluorescens* group. Food Microbiology. 39:116-126. DOI:10.1016/j.fm.2013.11.012

Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Bioinformatics*. http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Aoki, S. K., Webb, J. S., Braaten, B. A., & Low, D. A. (2009). Contact-Dependent Growth Inhibition Causes Reversible Metabolic Downregulation in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, *191*(6), 1777–1786. https://doi.org/10.1128/jb.01437-08

Arslan, S., Eyi, A., & Özdemir, F. (2011). Spoilage potentials and antimicrobial resistance of Pseudomonas spp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science*, *94*(12), 5851–5856. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4676

Asnicar, F., Thomas, A. M., Beghini, F., Mengoni, C., Manara, S., Manghi, P., Zhu, Q., Bolzan, M., Cumbo, F., May, U., Sanders, J. G., Zolfo, M., Kopylova, E., Pasolli, E., Knight, R., Mirarab, S., Huttenhower, C., & Segata, N. (2020). Precise phylogenetic analysis of microbial isolates and genomes from metagenomes using PhyloPhlAn 3.0. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-16366-7

Avrani, S., Bolotin, E., Katz, S., Hershberg, R. (2017). Rapid Genetic Adaptation during the First Four Months of Survival under Resource Exhaustion. Molecular Biology and Evolution. 34(7):1758–1769. DOI: 10.1093/molbev/msx118

Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R., & Oliver, J. D. (2015). Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. *Infection and Immunity*, *83*(11), 4194–4203. https://doi.org/10.1128/iai.00404-15

Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Brynildsen, M. P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J. J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J., Hardt, W., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D. T., Jenal, U., Levin, B. R., . . . Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(7), 441–448. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., … Alekseyev, M. A., and Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* DOI: 10.1089/cmb.2012.0021

Bigger, J. (1944). TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL INFECTIONS WITH PENICILLIN BY INTERMITTENT STERILISATION. *The Lancet*, *244*(6320), 497–500. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)74210-3

Billings, N., Millan, M. R., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., & Ribbeck, K. (2013). The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *PLoS Pathogens*, *9*(8), e1003526. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42–51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380

Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C. A., Ackermann, M., Kaever, V., Sourjik, V., Roth, V., & Jenal, U. (2010). Second Messenger-Mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, *141*(1), 107–116. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.018

Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2015). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of Pseudomonas spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, *54*, 142–153. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004

Caputo, L., Quintieri, L., Bianchi, D. M., Decastelli, L., Monaci, L., Visconti, A., & Baruzzi, F. (2014). Pepsin-digested bovine lactoferrin prevents Mozzarella cheese blue discoloration caused by Pseudomonas fluorescens. *Food Microbiology*, *46*, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.021

Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D., Mafu, A. A., Griffiths, M. W., & White, C. (1994). Psychrotrophs in dairy products: Their effects and their control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*(1), 1–30. https://doi.org/10.1080/10408399409527648

Chen, L., Daniel, R., & Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, *13*(4), 255–275. https://doi.org/10.1016/s0958-6946(02)00171-1

Chiesa, F., Lomonaco, S., Nucera, D., Garoglio, D., Dalmasso, A., & Civera, T. (2014). Distribution of Pseudomonas species in a dairy plant affected by occasional blue discoloration. *Italian Journal of Food Safety*, *3*(4). https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1722

Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., Howell, P. L., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2011). The Pel and Psl polysaccharides provide Pseudomonas aeruginosa structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, *14*(8), 1913–1928. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x

Craig, K., Johnson, B. R., & Grunden, A. (2021). Leveraging pseudomonas stress response mechanisms for industrial applications. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660134

Da Silva Alexandre, M. A., De Santana, T. N., Pena, L. A., Duarte, A. M., Santos, L. C. D., Alves, S. J. F., Dias, R. M., De Abreu Oliveira, A. V., Machado, S. G., & Eller, M. R. (2025). A comprehensive review on the prevalence and issues caused by Pseudomonas spp. in food. *Food Control*, 111428. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111428

Dainty, R. (1996). Chemical/biochemical detection of spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 19–33. https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01137-3

De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2010). Influence of storage conditions on the growth of pseudomonas species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(2), 460–470. https://doi.org/10.1128/aem.00521-10

Deatherage, D.E., Barrick, J.E. (2014). Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods in Molecular Biology*. 1151: 165–188. DOI: 10.1007/978-1-4939-0554-6_12

Del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2017). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by Pseudomonas fluorescens. *Food Control*, *86*, 359–366. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.001

Dogan, B., & Boor, K. J. (2003). Genetic Diversity and Spoilage Potentials among Pseudomonas spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 130–138. https://doi.org/10.1128/aem.69.1.130-138.2003

Drews, G., Schlegel, H. G., & Lengeler, J. W. (1998). Habitats of Prokaryotes. In *Biology of the Prokaryotes* (pp. 763–803). Blackwell Science Ltd. https://doi.org/10.1002/9781444313314.ch31

Feng, J., Kessler, D. A., Ben-Jacob, E., & Levine, H. (2013). Growth feedback as a basis for persister bistability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(1), 544–549. https://doi.org/10.1073/pnas.1320396110

Finkel, S. E. (2006). Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(2), 113–120. https://doi.org/10.1038/nrmicro1340

Fox, C., Chrisope, G., & Marshall, R. (1976). Incidence and identification of phospholipase C-Producing bacteria in fresh and spoiled homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, *59*(11), 1857–1864. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(76)84453-0

Ge, X., Cai, Y., Chen, Z., Gao, S., Geng, X., Li, Y., Li, Y., Jia, J., & Sun, Y. (2018). Bifunctional Enzyme SpoT Is Involved in Biofilm Formation of Helicobacter pylori with Multidrug Resistance by Upregulating Efflux Pump Hp1174 (gluP). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(11). https://doi.org/10.1128/aac.00957-18

Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., & Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of Bacterial persistence by HIPA. *Molecular Cell*, *52*(2), 248–254. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.045

Gessard, C. (1882). Sur les colorations bleue et verte des linges a pansements. *CR Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci*, *94*, 536-538

Ghafoor, A., Hay, I. D., & Rehm, B. H. A. (2011). Role of Exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation and Architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(15), 5238–5246. https://doi.org/10.1128/aem.00637-11

Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M., & Taddei, F. (2001). Costs and benefits of high mutation rates: Adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science*, *291*(5513), 2606–2608. https://doi.org/10.1126/science.1056421

Goeders, N., & Van Melderen, L. (2014). Toxin-Antitoxin systems as multilevel interaction systems. *Toxins*, *6*(1), 304–324. https://doi.org/10.3390/toxins6010304

Gomila, M., PeÃ±A, A., Mulet, M., Lalucat, J., & GarcÃa-ValdÃ©S, E. (2015). Phylogenomics and systematics in Pseudomonas. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00214

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *78*(1–2), 79–97. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00233-7

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086 https://doi.org/10.1038/s41467-020-16366-7

Halvorsen, T. M., Schroeder, K. A., Jones, A. M., Hammarlöf, D., Low, D. A., Koskiniemi, S., & Hayes, C. S. (2024). Contact-dependent growth inhibition (CDI) systems deploy a large family of polymorphic ionophoric toxins for inter-bacterial competition. *PLoS Genetics*, *20*(11), e1011494. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011494

Hayes, C. S., & Low, D. A. (2009). Signals of growth regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, *12*(6), 667–673. https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.09.006

Hayward, C., Brown, M. H., & Whiley, H. (2022). Hospital water as the source of healthcare-associated infection and antimicrobial-resistant organisms. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *35*(4), 339–345. https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000842

Hobby, G. L., Meyer, K., & Chaffee, E. (1942). Observations on the mechanism of action of penicillin. *Experimental Biology and Medicine*, *50*(2), 281–285. https://doi.org/10.3181/00379727-50-13773

İzgördü, Ö. K., Darcan, C., & Kariptaş, E. (2022). Overview of VBNC, a survival strategy for microorganisms. *3 Biotech*, *12*(11). https://doi.org/10.1007/s13205-022-03371-4

Jørgensen, M. G., Pandey, D. P., Jaskolska, M., & Gerdes, K. (2008). HicA of Escherichia coli Defines a Novel Family of Translation-Independent mRNA Interferases in Bacteria and Archaea. *Journal of Bacteriology*, *191*(4), 1191–1199. https://doi.org/10.1128/jb.01013-08

Katz, S., Avrani, S., Yavneh, M., Hilau, S., Gross, J., & Hershberg, R. (2021). Dynamics of adaptation during three years of evolution under Long-Term Stationary Phase. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 2778–2790. https://doi.org/10.1093/molbev/msab067

Klein, S., Lorenzo, C., Hoffmann, S., Walther, J. M., Storbeck, S., Piekarski, T., Tindall, B. J., Wray, V., Nimtz, M., & Moser, J. (2008). Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Molecular Microbiology*, *71*(3), 551–565. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06562.x

Kumar, H., Franzetti, L., Kaushal, A., & Kumar, D. (2019). Pseudomonas fluorescens: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology*, *69*(9), 873–883. https://doi.org/10.1007/s13213-019-01501-7

Lalucat, J., Gomila, M., Mulet, M., Zaruma, A., & García-Valdés, E. (2021). Past, present and future of the boundaries of the Pseudomonas genus: Proposal of Stutzerimonas gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*, *45*(1), 126289. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126289

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. DOI: 10.1038/nmeth.1923

Lenski, R. E., Rose, M. R., Simpson, S. C., & Tadler, S. C. (1991). Long-Term Experimental Evolution in Escherichia coli. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *The American Naturalist*, *138*(6), 1315–1341. http://www.jstor.org/stable/2462549

Letunic, P. Bork. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Res., 49 (W1) (2021), pp. W293-W296, 10.1093/nar/gkab301

Li, Y., Wang, Z., Qing, J., Hu, D., Vo, H. T., Thi, K. T., Wang, X., & Li, X. (2024). Application of propidium monoazide quantitative PCR to discriminate of infectious African swine fever viruses. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1290302

Liu, K., Bittner, A. N., & Wang, J. D. (2015). Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. *Current Opinion in Microbiology*, *24*, 72–79. https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.012

Llorens, J. M. N., Tormo, A., & Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *34*(4), 476–495. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x

Lopez, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(7), a000398. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398

MacLean, R. C., Bell, G., & Rainey, P. B. (2004). The evolution of a pleiotropic fitness tradeoff in Pseudomonas fluorescens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(21), 8072–8077. https://doi.org/10.1073/pnas.0307195101

Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., & Gerdes, K. (2013). RETRACTED: (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell*, *154*(5), 1140–1150. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.048

Martin, M. (2011). Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet Journal*. DOI: /10.14806/ej.17.1.200

McDougald, D., Gong, L., Srinivasan, S., Hild, E., Thompson, L., Takayama, K., Rice, S.A., Kjelleberg, S. (2002). Defences against oxidative stress during starvation in bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 81, 3–13. DOI: /10.1023/A:1020540503200

Minh, H.A. Schmidt, O. Chernomor, D. Schrempf, M.D. Woodhams, A. von Haeseler, R. Lanfear. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol. Biol. Evol., 37 (5) (2020), pp. 1530-1534, 10.1093/molbev/msaa015

Molina, G., Pimentel, M. R., & Pastore, G. M. (2013). Pseudomonas: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(5), 1851–1864. https://doi.org/10.1007/s00253-013-4701-8

Moore, N. M., & Flaws, M. L. (2011). Introduction: Pseudomonas aeruginosa. *American Society for Clinical Laboratory Science*, *24*(1), 41–42. https://doi.org/10.29074/ascls.24.1.41

Moyed, H. S., & Bertrand, K. P. (1983). hipA, a newly recognized gene of Escherichia coli K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*, *155*(2), 768–775. https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983

Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the Pseudomonas species. *Environmental Microbiology*, *12*(6), 1513–1530. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x

Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and Nutrient-Limited bacteria. *Science*, *334*(6058), 982–986. https://doi.org/10.1126/science.1211037

Oliver, J. D. (2000). The public health significance of viable but nonculturable bacteria. In *Springer eBooks* (pp. 277–300). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0271-2_16

Olson, R.D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J.J., … Stevens, R.L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*. DOI: 10.1093/nar/gkac1003

Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., Ambroa, A., López, M., Bou, G., Cantón, R., Garcia-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomás, M. (2020). (p)ppGpp and Its Role in Bacterial Persistence: New Challenges. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(10). https://doi.org/10.1128/aac.01283-20

Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, *12*(4), 208–214. https://doi.org/10.1038/nchembio.2044

Pletnev, P. I., Osterman, I. A., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., & Dontsova, O. A. (2015). Survival guide: Escherichia coli in the stationary phase. *Acta Naturae*, *7*(4), 22–33. https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-4-22-33

Quintieri, L., Fanelli, F., Zühlke, D., Caputo, L., Logrieco, A. F., Albrecht, D., & Riedel, K. (2020). Biofilm and Pathogenesis-Related Proteins in the Foodborne P. fluorescens ITEM 17298 With Distinctive Phenotypes During Cold Storage. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00991

Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C.T., Ferrús, M.A. and Carrascosa, C. (2016). Food Spoilage by *Pseudomonas* spp.—An Overview. In Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance, O.V. Singh (Ed.). https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch3

Rodrigues, C., David, G. Q., & Reis, A. R. D. (2022). Photograph registration of petri dishes in high quality and image editing of microbiological assays. *International Microbiology*, *25*(3), 561–570. https://doi.org/10.1007/s10123-022-00242-z

Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B. T. C., & Paparella, A. (2016). Influence of incubation conditions on biofilm formation by Pseudomonas fluorescens isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian Journal of Food Safety*, *5*(3). https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5793

Rotem, E., Loinger, A., Ronin, I., Levin-Reisman, I., Gabay, C., Shoresh, N., Biham, O., & Balaban, N. Q. (2010). Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(28), 12541–12546. https://doi.org/10.1073/pnas.1004333107

Saati-Santamaría, Z., Baroncelli, R., Rivas, R., & García-Fraile, P. (2022). Comparative genomics of the genus pseudomonas reveals host- and Environment-Specific evolution. *Microbiology Spectrum*, *10*(6). https://doi.org/10.1128/spectrum.02370-22

Samaržija, D., Zamberlin, Š., & Pogačić, T. (2012). Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*. https://doaj.org/article/13b2c61b15e346c68f57f321e45367e4

Shpigel, N. Y., Pasternak, Z., Factor, G., & Gottlieb, Y. (2015). Diversity of Bacterial Biofilm Communities on Sprinklers from Dairy Farm Cooling Systems in Israel. *PLoS ONE*, *10*(9), e0139111. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139111

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). Pseudomonas genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(4), 652–680. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x

Srikumaran, S. (2020). Leukotoxins. Toxins. 12(4), 231. DOI: /10.3390/toxins12040231

Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. (2020). Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 8671. https://doi.org/10.3390/ijms21228671

Van Den Bergh, B., Fauvart, M., & Michiels, J. (2017). Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 219–251. https://doi.org/10.1093/femsre/fux001

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2012). Diversity and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from drinking water. *The Science of the Total Environment*, *426*, 366–374. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046

Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Susilowati, H., Kayama, S., Hirota, K., & Miyake, Y. (2006). Functional Analysis of spoT, relA and dksA Genes on Quinolone Tolerance in Pseudomonas aeruginosa under Nongrowing Condition. *Microbiology and Immunology*, *50*(4), 349–357. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x

Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X., & Zhou, G. (2018). Biofilm formation by meat-borne Pseudomonas fluorescens on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control*, *91*, 397–403. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.035

Williamson, D. L., Gasparich, G. E., Regassa, L. B., Saillard, C., Renaudin, J., Bove, J., & Whitcomb, R. F. (2010). Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. In *Springer eBooks*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4

Zambrano, M. M., Siegele, D. A., Almirón, M., Tormo, A., & Kolter, R. (1993). Microbial Competition: Escherichia coli Mutants That Take Over Stationary Phase Cultures. *Science*, *259*(5102), 1757–1760. https://doi.org/10.1126/science.7681219

Zhu, L., Shuai, X., Xu, L., Sun, Y., Lin, Z., Zhou, Z., Meng, L., & Chen, H. (2021). Mechanisms underlying the effect of chlorination and UV disinfection on VBNC state Escherichia coli isolated from hospital wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, *423*, 127228. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127228

Zinser, E. R., & Kolter, R. (2004). Escherichia coli evolution during stationary phase. *Research in Microbiology*, *155*(5), 328–336. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.014

Zion, S., Katz, S., Hershberg, R. (2024). *Escherichia coli* adaptation under prolonged resource exhaustion is characterized by extreme parallelism and frequent historical contingency. *bioRxiv*. DOI: /10.1101/2024.03.21.586114

RINGRAZIAMENTI

Questo traguardo non sarebbe stato possibile senza il supporto e l'affetto di tantissime persone che hanno reso il mio percorso universitario un'esperienza di vita ricca e indimenticabile.

Un grazie di cuore alla Professoressa Cardazzo, per avermi offerto questa incredibile opportunità, accogliendomi nel suo gruppo di ricerca e facendomi lavorare ad un suo progetto. La sua fiducia è stata fondamentale.
Voglio ringraziare davvero tanto Lisa, che è stata per me una guida preziosa, una collega e soprattutto un'amica speciale, capace di sostenermi e farmi sorridere sia in laboratorio che fuori. Grazie per la tua infinita disponibilità e per tutti i tuoi preziosi insegnamenti!

Un abbraccio fortissimo alle mie coinquiline Sofia, Francesca e Giulia. In questi due anni siete state la mia famiglia lontano da casa. Dopo due anni di "casa su" e "casa giù", mi avete insegnato che "casa" sono le persone. Siete state un porto sicuro, facendomi sentire a casa anche quando la nostalgia si faceva sentire più forte. Grazie per ogni momento felice e indimenticabile che abbiamo condiviso.

Grazie ai miei compagni di avventura Lucrezia, Gabriele, Chiara, Silvia e Aurora. Sono stata davvero fortunata ad avervi incontrato. Insieme abbiamo affrontato e condiviso molto di più dello studio "matto e disperatissimo", creando legami che porto nel cuore.

Grazie alle mie amiche Anna, Chiara, Rebecca e Marta e ai miei amici Giulio e Dario, che nonostante la distanza e il poco tempo, mi hanno sempre dimostrato il loro affetto, facendomi sentire sempre pensata e voluta bene. Siete la prova che l'amicizia vera supera la distanza.

Ad Ivan, che dopo quattro anni, fermo come una roccia, sei sempre al mio fianco, pronto a supportarmi e a incoraggiarmi in ogni passo con la tua pazienza e il tuo incredibile supporto. Non potrei chiedere di più.

Un grazie immenso a tutta la mia famiglia, che con il suo amore e il suo costante sostegno ha reso possibile tutto questo, accompagnandomi e venendomi incontro in ogni singolo momento di questi due anni.

Infine, grazie a questa università e a questa città. Qui ho imparato, sono cresciuta e ho guadagnato molto più di una semplice laurea: ho costruito ricordi, amicizie e un pezzo importante della mia vita.