



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

Tesi di Laurea

Valutazione degli effetti alteranti di ceppi di
Pseudomonas fluorescens in alimenti

Relatore: Dott.ssa Barbara Cardazzo

Dip. di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Correlatore: Dott.ssa Nadia Andrea Andreani

Dip. di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Laureando: Alberto Donà
Matricola n.: 1034615

ANNO ACCADEMICO 2012/2013

“L'esperto è una persona che ha fatto in un campo
molto ristretto tutti i possibili errori”

Neils Bohr

Alla mia famiglia

e

Ad Anna

INDICE

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1 Il genere <i>Pseudomonas</i> : caratteristiche.....	3
1.2 Tassonomia	5
1.3 Isolamento e caratterizzazione di <i>Pseudomonas</i> : tecniche microbiologiche.....	9
1.4 Caratterizzazione di <i>Pseudomonas</i> : tecniche di biologia molecolare.....	12
1.5 <i>Pseudomonas</i> come patogeno dell'uomo	14
1.6 <i>Pseudomonas</i> come agente alterante negli alimenti	15
2. SCOPO DELLA TESI	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 Campionamento dei ceppi	21
3.2 Isolamento di ceppi di <i>Pseudomonas</i> da pancetta	25
3.3 Amplificazione della regione 16S dei ceppi isolati da pancetta mediante metodica PCR.....	26
3.4 Sequenziamento dei prodotti PCR.....	28
3.5 Analisi bioinformatiche delle sequenze ottenute	29
3.5.1 Finch TV	29
3.5.2 BLAST	29
3.6 Valutazione di caratteri fenotipici dei ceppi di <i>P. fluorescens</i>	29
3.7 <i>Software R</i>	31
3.8 <i>Challenge test</i> su mozzarella	32
3.9 Metodica di PCR per l'esecuzione del <i>Multilocus Sequence Typing</i>	32
3.10 Sequenziamento dei prodotti PCR.....	34
3.11 Analisi bioinformatiche - Finch TV e allineamento delle sequenze <i>FOR</i> e <i>REV</i> ... 34	
3.12 Analisi filogenetiche	35
3.12.1 Identificazione dei <i>Sequence Type</i>	35
3.12.2 DnaSP	35
3.12.3 PhyML	36
3.13 Analisi bioinformatiche per la ricerca e l'utilizzo delle sequenze di <i>AprX</i>	36
3.13.1 Ricerca di proteasi termoresistenti (<i>AprX</i>) nei vari genomi completi di <i>Pseudomonas fluorescens</i> disponibili <i>online</i>	36
3.13.2 Allineamento delle sequenze delle <i>AprX</i> e creazione dell'albero filogenetico	36
3.13.3 Disegno di <i>primer</i> specifici per il gene <i>aprX</i>	37
3.14 PCR <i>end point</i> e scelta della coppia di <i>primer</i>	38
3.15 Amplificazione delle sequenze <i>aprX</i> dei ceppi di referenza.....	39
3.16 Sequenziamento delle sequenze <i>aprX</i> mediante metodo Sanger.....	40
3.17 Analisi bioinformatiche	40
3.17.1 Finch TV	40
3.17.2 Allineamento delle sequenze e ottenimento dell'albero filogenetico.....	41
3.18 Estrazione del DNA dai ceppi di referenza	41
3.19 Quantificazione del DNA mediante NanoDrop.....	42
3.20 Messa a punto della metodica di <i>Real Time PCR</i>	42

3.20.1	La metodica <i>Real Time</i> PCR	42
3.20.2	Disegno dei <i>primer</i>	44
3.20.3	Determinazione dell'efficienza della reazione	44
3.21	Saggio TNBS	46
3.21.1	Preparazione dei campioni	47
3.21.2	Costruzione delle rette di taratura	48
3.21.3	Valutazione degli amminoacidi liberi	51
4.	RISULTATI	53
4.1	Isolamento di ceppi di <i>Pseudomonas</i> da pancetta	53
4.2	Valutazione di caratteri fenotipici dei ceppi di <i>Pseudomonas fluorescens</i>	54
4.3	<i>Clustering analysis</i> con <i>Software R</i>	60
4.4	<i>Challenge test</i> su mozzarella	60
4.5	Amplificazione dei loci <i>glnS</i> , <i>gyrB</i> , <i>ileS</i> , <i>nuoD</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoD</i>	61
4.6	Identificazione degli alleli e dei <i>Sequence Type</i>	61
4.7	Analisi della variabilità genetica	64
4.8	Analisi filogenetiche	66
4.9	Ricerca di proteasi termoresistenti (AprX) nei genomi completi disponibili <i>online</i>	68
4.10	Allineamento e creazione dell'albero filogenetico	68
4.11	Disegno e scelta della coppia di <i>primer</i>	69
4.12	Amplificazione delle sequenze <i>aprX</i> dei ceppi di riferimento	70
4.13	Sequenziamento dei prodotti PCR	71
4.14	Ottenimento di un albero filogenetico di tipo <i>Maximum Likelihood</i>	72
4.15	Estrazione del DNA dai ceppi di riferimento per la messa a punto del saggio <i>Real Time</i> PCR e quantificazione	74
4.16	Determinazione dell'efficienza del saggio <i>Real Time</i>	74
4.17	Valutazione del potenziale proteolitico nei ceppi di riferimento (saggio TNBS per la determinazione degli amminoacidi liberi)	76
4.17.1	Preparazione dei campioni	77
4.17.2	Costruzione delle rette di taratura	77
4.17.3	Valutazione degli amminoacidi liberi	78
5.	DISCUSSIONE	83
6.	CONCLUSIONI	91
	BIBLIOGRAFIA	93

RIASSUNTO

I batteri del genere *Pseudomonas*, in particolare quelli appartenenti allo *Pseudomonas fluorescens group*, ricoprono un ruolo di primaria importanza per quanto riguarda la contaminazione e alterazione degli alimenti.

Essi sono infatti in grado di secernere una vasta quantità di enzimi, quali proteasi, lipasi e lecitinasi, oltre a pigmenti di varia natura, che alterano irrimediabilmente le caratteristiche organolettiche del prodotto alimentare.

Per questo motivo, nel presente lavoro è stata effettuata una caratterizzazione fenotipica di 97 ceppi di *Pseudomonas fluorescens* presenti nella ceppoteca del laboratorio di Microbiologia degli Alimenti del Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione. L'analisi ha mostrato che non tutti i ceppi producono pigmenti e la maggior parte produce un pigmento giallo; inoltre, l'attività proteolitica è stata osservata nella quasi totalità dei ceppi, mentre le attività lipasica e lecitinasica sono state osservate con minor frequenza. La caratterizzazione fenotipica è stata sottoposta ad analisi statistica che ha permesso la suddivisione dei ceppi in 4 *cluster* distinti in base alla capacità di produrre enzimi alle diverse temperature.

Uno dei ceppi caratterizzati, inizialmente isolato da una pancetta che presentava una colorazione blu, è stato sottoposto a un *challenge test* su mozzarella dove ha prodotto nuovamente il pigmento blu.

In seguito, tre ceppi (tra i quali quello isolato da pancetta), sono stati caratterizzati mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST), integrando la caratterizzazione molecolare, già avvenuta per altri 94 ceppi presenti nella ceppoteca del laboratorio e per 6 ceppi presenti su GenBank con genoma completamente sequenziato, effettuata dal gruppo di lavoro della Dott.ssa Barbara Cardazzo. Attraverso l'ottenimento di un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood*, l'analisi ha permesso di identificare due gruppi principali, uno dei quali suddiviso in cinque distinti sottogruppi. Integrando i dati molecolari con quelli fenotipici, non è stata riscontrata una correlazione tra attività enzimatica e gruppo filogenetico, mentre la produzione del pigmento blu è associata a ceppi che fanno parte di un ramo filogenetico distinto, nel quale sono presenti anche quattro ceppi non produttori.

Infine, è stato messo a punto un saggio di tipo *Real Time PCR* in grado di evidenziare i livelli di espressione del gene *aprX*. Questo gene codifica per una proteasi

termoresistente (AprX) in grado di alterare le caratteristiche organolettiche di prodotti alimentari che vengono sottoposti a trattamenti termici, come ad esempio il latte UHT.

Il saggio di *Real Time* PCR che è stato disegnato ha permesso una corretta amplificazione e le efficienze delle rette sono risultate molto buone. Attualmente sono in corso studi per migliorare la resa dell'estrazione dell'RNA batterico partendo dalla matrice latte.

Infine, parallelamente alla messa a punto del metodo molecolare, è stato effettuato un saggio TNBS per misurare la proteolisi nel latte ad opera di *Pseudomonas fluorescens*. Dall'analisi è emerso che, nonostante i ceppi possiedano nel loro corredo genetico il gene *aprX*, non tutti sono in grado di produrre la proteasi termoresistente e portare quindi ad una proteolisi delle proteine del latte.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il genere *Pseudomonas*: caratteristiche

Il genere *Pseudomonas*, dal greco *pseudo-* (*ψευδο*: falso) e *-monas* (*μονος*: singola unità) comprende un gran numero di batteri di forma bastoncellare, dritti o lievemente ricurvi, Gram negativi, di dimensioni comprese tra 0,5-1,0 μm x 1,5-5 μm , dotati di uno o più flagelli polari che ne consentono la mobilità, privi di rivestimenti esterni e di capsula.

Sono batteri chemioeterotrofi (alcuni sono in grado di utilizzare anche gli idrocarburi policiclici aromatici come fonte di carbonio) con metabolismo aerobio, in genere ossidasi positivi e asporigeni. Crescono rapidamente su appositi terreni di coltura, dove sviluppano colonie tonde, lisce e con caratteristico odore d'uva.

La loro temperatura di crescita varia da 25°C a 35°C, infatti si tratta di microrganismi mesofili e psicrotolleranti che sono anche in grado di replicarsi alle temperature di refrigerazione e di sopravvivere al di sotto degli 0°C; tuttavia non tollerano le alte temperature, anche se alcuni ceppi come *Pseudomonas aeruginosa* sono in grado di crescere anche a 42°C, ma non sopravvivono a trattamenti di pastorizzazione effettuati oltre i 65-70°C per tempi superiori a 15-30 secondi.

Sono microrganismi normodurici, infatti non tollerano pH eccessivamente acidi: non si replicano a pH inferiori a 5,0 e rallentano moltissimo la loro duplicazione già al di sotto di pH 5,8.

I batteri del genere *Pseudomonas* sono ubiquitari, infatti si possono riscontrare in svariati ambienti quali acqua, suolo, vegetazione, materiale organico in decomposizione e hanno la capacità di adattarsi anche in ambienti ostili, essendo microrganismi con scarse esigenze nutrizionali.

Questa grande adattabilità è dovuta alla capacità di produrre composti extracellulari, come ad esempio pigmenti diffusibili, che possono portare a molteplici vantaggi: per esempio la piocianina, di colore blu-verde, ha azione antibiotica nei confronti di altri batteri come *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*, mentre la pioverdina, di colore verde, agisce come sideroforo. Altri pigmenti che vengono comunemente prodotti sono la fluoresceina (colore giallo), la piorubina (colore rosso-marrone) e la piomelanina (colore nero). Tra le specie del genere *Pseudomonas* in grado di produrre tali pigmenti

ricordiamo *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *P. putida* e *P. chlororaphis*.

Inoltre, la grande capacità di adattamento ai diversi ambienti è data dal fatto che questi microrganismi sono in grado di formare biofilm, ovvero un'aggregazione di batteri contraddistinta dalla secrezione di una matrice extracellulare adesiva in cui le cellule risultano strettamente attaccate l'una all'altra. In questo modo la "comunità" batterica risulta essere molto resistente, anche nei confronti di antibiotici e all'azione di anticorpi e fagociti.

In alternativa a fenomeni sessili come il biofilm, *Pseudomonas* è in grado di muoversi grazie alla rapida rotazione dei flagelli per mezzo di molteplici meccanismi di movimento come ad esempio lo *Swarming*, in cui le cellule vegetative si differenziano in cellule *swarm*, lunghe ed iperflagellate, e la rotazione dei flagelli avviene da parte di molti microrganismi contemporaneamente. Grazie a questa motilità, indotta dal contatto con superfici aventi un'appropriata viscosità e composizione, i batteri sono in grado di muoversi su superfici solide. Altri si muovono mediante *Swimming*, dove il meccanismo di movimento è analogo al precedente, ma viene effettuato da ogni singola cellula in modo autonomo. Altri ancora usano il meccanismo *Twitching* che prevede la presenza di un pilo di tipo IV che si protrae nella direzione di movimento e si ancora alla superficie, rendendo possibile la traslocazione della cellula microbica. Vi sono inoltre meccanismi di movimento che interessano *Pseudomonas* che non prevedono l'utilizzo di pili o flagelli, come ad esempio il *Gliding*, oppure lo *Sliding* che si basa sulla secrezione di agenti surfattanti che riducono l'attrito tra le cellule e la superficie.

Attualmente il genere *Pseudomonas* riceve grande interesse in ambito alimentare perché questi microrganismi sono in grado di alterare fortemente le caratteristiche organolettiche del prodotto; inoltre vi sono alcune specie patogene per l'uomo, come ad esempio *P. aeruginosa* che può causare infezioni cutanee, infezioni delle vie urinarie o anche infezioni polmonari, grazie a numerosi fattori di virulenza. Essa è potenzialmente in grado di infettare qualsiasi distretto corporeo, tuttavia va ricordato che non è in grado di portare patologie importanti in soggetti immunocompetenti. Altre specie che possono essere patogene per l'uomo sono ad esempio *P. putida*, *P. acidovarans* o *P. paucimobilis*.

Numerose specie sono invece patogene per gli animali (*P. anguilliseptica* nei pesci come l'anguilla; *P. chlororaphis* negli uccelli) (Peix et al., 2009), mentre altre sono patogene per le piante: *P. syringae*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. savastanoi*.

1.2 Tassonomia

I batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* fanno parte della famiglia delle *Pseudomonaceae*, all'ordine *Pseudomonadales* e alla classe γ -*Proteobacteria*.

La complessità e la grande rilevanza che questo genere ha assunto hanno portato ad un continuo riesame dal punto di vista tassonomico.

Inizialmente i batteri venivano classificati secondo uno schema di catalogazione naturale, proposto da Ferdinand Cohn nel 1872, che si basava sull'osservazione dei caratteri morfologici delle cellule. Sostanzialmente Cohn aveva suddiviso i batteri in gruppi che possedevano gli stessi caratteri fenotipici, quali forma e dimensione della cellula, presenza/assenza di pili o flagelli e del loro posizionamento, colore e morfologia della colonia. Tuttavia questo sistema di classificazione non teneva conto delle relazioni evolutive dei vari organismi.

In seguito, nel 1909, Orla-Jensen propose un modello che teneva in considerazione le proprietà fisiologiche dei batteri, come ad esempio le esigenze nutrizionali, la composizione della parete cellulare, i prodotti di fermentazione, i tipi di substrato di carbonio e azoto utilizzati, la resistenza osmotica, la crescita in presenza o meno di ossigeno e così via, senza tenere conto però della patogenicità nei confronti di uomo, animali e piante.

Nel 1923 nella prima edizione del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, venivano tenute in considerazione non solo le proprietà morfologiche e fisiologiche, ma anche la patogenicità dei diversi batteri.

All'interno di questo manuale compariva per la prima volta il nome *Pseudomonas*, assegnato dal botanico tedesco Walter Emil Friedrich August Migula nel 1884, quando descrisse il batterio come "cellule dotate di motilità grazie alla presenza di un flagello a un polo della cellula, solo in taluni casi in grado di formare spore". Ovviamente questa era una descrizione troppo breve e inaccurata, visto che il fatto di essere sporigeno non rispecchia le reali caratteristiche del genere.

La scelta del nome sembra essere ricaduta su *Pseudomonas* per il semplice fatto che i batteri in questione assomigliavano ai *Monas*, microrganismi flagellati dotati di motilità intrinseca. Inoltre come *type species*, Migula propose *Pseudomonas pyocyanea*, oggi conosciuta come *Pseudomonas aeruginosa*.

Nel 1926 L.E. den Dooren de Jong pubblicò una tesi in cui mise in evidenza la capacità di *Pseudomonas* di decomporre numerose molecole organiche, alcune anche tossiche

per altri microrganismi e organismi superiori.

Il numero di specie assegnate a *Pseudomonas* toccò quota 800 verso la metà del secolo e dalla fine degli anni '60 la loro determinazione seguiva i parametri descritti nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* da Haynes e Burkholder, dove venivano utilizzate proprietà fenotipiche come le caratteristiche di crescita delle colonie in terreni agarizzati e/o caratteristiche nutrizionali.

Nel 1960 il microbiologo canadese Roger Yate Stanier propose una riesamina del genere, che prevedeva saggi fenotipici per determinarne il profilo nutrizionale. In questo modo sono state definite un certo numero di specie in funzione della capacità di crescita sui diversi substrati testati e il lavoro è stato esteso anche ad altri generi. Tra il 1966 e il 1973 vi è stato il completamento di questo lavoro grazie all'ausilio di numerosi tassonomi come ad esempio Redfearn, Ballard, Palleroni, Doudoroff, Barret, Johnson (Palleroni, 2010).

Più recentemente la classificazione mediante caratteri fenotipici è stata sostituita da metodiche molecolari basate sull'analisi degli acidi nucleici, come ad esempio l'ibridazione DNA/DNA. In molti casi grazie a questa tecnica è stata confermata la classificazione fenotipica, ma in altri non vi era omologia tra coppie di ceppi molto simili per le loro caratteristiche fenotipiche. Questa grande eterogenicità genomica all'interno del *taxon* è stata in parte osservata anche per le diverse dimensioni del genoma delle differenti specie del genere, infatti si va da 3,7 Mbp di *Pseudomonas strutzeri* a 7,1 Mbp di *Pseudomonas aeruginosa* (Spiers *et al.*, 2000).

Per portare un miglioramento alla classificazione, nel 1973 è stata messa a punto l'ibridazione RNA/DNA (Palleroni *et al.*, 1973), tecnica che ha permesso di identificare, in base alle caratteristiche dell'RNA ribosomiale, 5 diversi gruppi di *Pseudomonas*: *rRNA group I, II, III, IV, V*. Attualmente, la definizione del genere in uso è la seguente: “*Il genere Pseudomonas è un'entità multigenica che può essere suddivisa in cinque gruppi di specie abbastanza distanti, di cui solo uno può propriamente essere chiamato Pseudomonas*”.

Per questo motivo il gruppo I viene anche detto “*Pseudomonas sensu stricto*”, al quale appartengono *P. aeruginosa*, tutte le specie fluorescenti (*P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. putida*) e alcune specie non fluorescenti (*P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. strutzeri*, *P. mendocina*).

Le specie presenti nel gruppo III sono state suddivise in tre generi differenti, denominati *Comamonas*, *Acidovorax* e *Hydrogenophaga*, mentre i gruppi IV e V risultano molto

distanziati rispetto agli altri 3.

Nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* la situazione intragenetica viene descritta come indicato in figura 1.1.

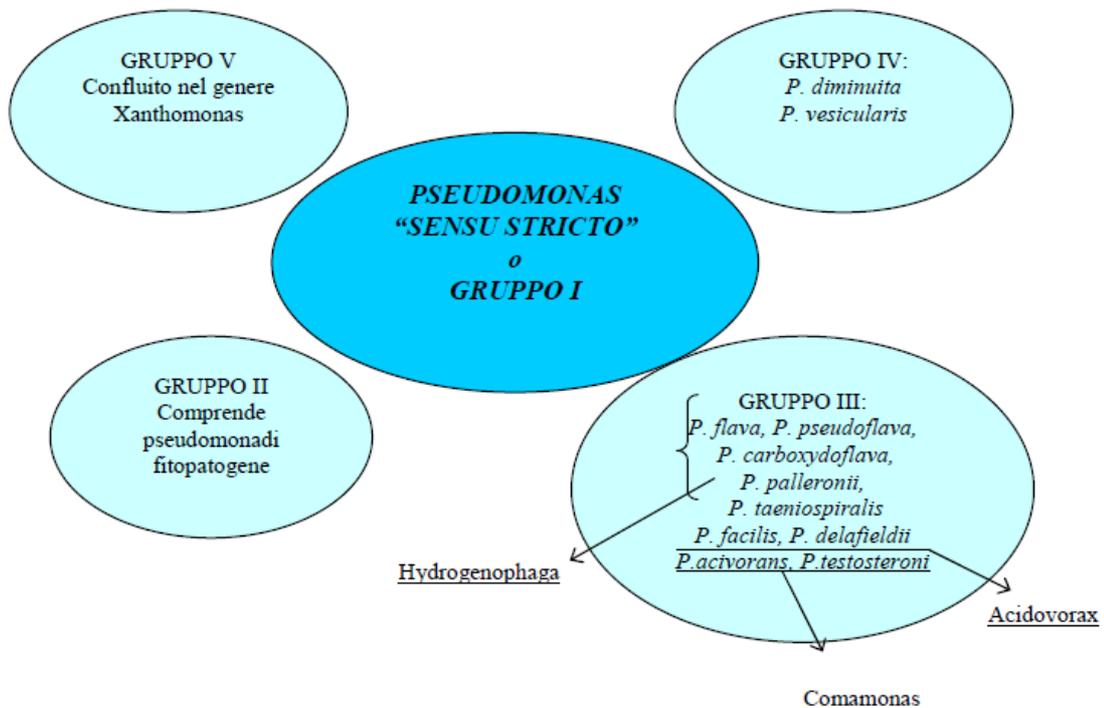


Figura 1.1: suddivisione dei cinque gruppi di *Pseudomonas* con relative specie, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Negli anni '90, grazie allo sviluppo di *database* e in seguito al grande utilizzo di tecniche molecolari per l'analisi genetica e alla grande disponibilità di sequenze di rRNA 16S, i batteri sono stati suddivisi in tre diverse classi di proteobatteri: α , β e γ . *Pseudomonas sensu stricto*, come detto in precedenza, appartiene ai γ -Proteobacteria.

Uno studio più recente, basato sull'analisi dell'rRNA 16S di 128 specie diverse del genere *Pseudomonas*, ha permesso la suddivisione del gruppo *Pseudomonas sensu stricto* in sette *sub cluster*: *Pseudomonas syringae group*, *Pseudomonas chlororaphis group*, *Pseudomonas fluorescens group*, *Pseudomonas putida group*, *Pseudomonas strutzeri group*, *Pseudomonas aeruginosa group* e *Pseudomonas pertucinogena group* (Anzai et al., 2000).



Figura 1.2: ricostruzione filogenetica delle specie di *Pseudomonas fluorescens* basata sull'analisi delle sequenze dell'RNA ribosomiale 16S (Anzai et al., 2000)

Questa classificazione è in totale accordo con quella effettuata da Palleroni grazie all'ibridazione DNA-RNA (Palleroni, 1984).

Tuttavia, nonostante lo studio di Anzai e colleghi abbia portato ad una significativa svolta nella classificazione del genere, l'analisi delle sequenze nucleotidiche del 16S non può essere utile a discriminare tutte le specie, dato che è presente in tutti gli organismi e presenta basso tasso di evoluzione ed elevata conservazione.

Per questo motivo sono stati numerosi gli studi in cui alle sequenze del 16S sono stati affiancati altri geni *housekeeping*: *gyrB* e *rpoD* (Yamamoto et al., 2000); *atpD*, *carA*, *recA* (Hilario et al., 2004); *rpoB* e *rpoD* (Mulet et al., 2009). Mulet ha inoltre affiancato l'analisi delle sequenze IST (*Internally Transcribed Spacer*), ovvero sequenze di RNA non funzionale che presentano dimensioni e composizione nucleotidica molto diverse in organismi vicini dal punto di vista filogenetico.

Negli ultimi anni vi è stata dunque una continua evoluzione del numero di ceppi di *Pseudomonas*, infatti nel 2006 i ceppi riconosciuti erano 102, per poi passare a 109 l'anno successivo e 119 nel 2009 (Mulet et al., 2010).

Per descrivere una nuova specie è indispensabile che i dati molecolari vengano implementati con la caratterizzazione fenotipica, secondo l'approccio polifasico. Le tecniche maggiormente utilizzate per la caratterizzazione del fenotipo sono ad esempio la produzione di pigmenti, crescita a temperature controllate, richiesta di composti azotati o del carbonio, denitrificazione, liquefazione della gelatina, necessità di fattori di crescita.

Attualmente sono state riconosciute 205 specie diverse all'interno del genere *Pseudomonas* e l'elenco può essere consultato nel sito <http://www.bacterio.net/>.

1.3 Isolamento e caratterizzazione di *Pseudomonas*: tecniche microbiologiche

Nonostante stiano prendendo sempre più piede le metodiche molecolari che prevedono l'analisi del genotipo, le metodiche microbiologiche per l'isolamento e la caratterizzazione del fenotipo ricoprono un ruolo di primaria importanza.

Tra le tecniche microbiologiche classiche (non DNA-based) più utilizzate abbiamo:

- Caratterizzazione morfologica della cellula: grazie alla colorazione di Gram possono essere descritte la forma e le dimensioni del batterio o l'eventuale

presenza dei flagelli. Può essere effettuata mediante la crescita selettiva su terreni di coltura agarizzati dove è possibile apprezzare la forma, le dimensioni e il colore delle colonie batteriche, inoltre si possono valutare anche le caratteristiche nutrizionali grazie alla capacità dei microrganismi di degradare particolari molecole come ad esempio acidi organici, amminoacidi o polialcoli (in questo caso nel terreno vi sono indicatori di variazione del pH, oppure si valuta la produzione di gas);

- Crescita a diverse condizioni ambientali: variazione di temperatura, pH, presenza di inibenti, nutrienti, additivi;
- Profili di antibiotico-resistenza: viene valutata la capacità dei ceppi di resistere o meno a determinati antibiotici;
- Tecniche immunochimiche: vengono studiati i diversi antigeni mediante la selettiva interazione antigene-anticorpo. Si utilizzano per esempio saggi ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) o RIA (*Radioimmunoassay*).
- Produzione di antibiotici o enzimi: su terreni agarizzati può essere per esempio visualizzata la secrezione di proteasi, fosfolipasi C e lipasi.
- Test della catalasi, dell'ossidasi o test di motilità.

Per l'isolamento e la numerazione di *Pseudomonas* spp. in campioni alimentari si fa riferimento alla normativa ISO 13720:1995 e si utilizza il terreno selettivo *Pseudomonas Agar Base* (PAB) addizionato con cefamandolo, fucidina e cefaloridina (*CFC supplement*). Il terreno prende dunque il nome CFC PAB e su di esso vengono piastrate quantità note di sospensione batterica e le relative diluizioni. Le piastre vengono in seguito incubate a 25°C per 48 ore in aerobiosi. La normativa prevede che in seguito alla conta batterica, 5 colonie vengano trasferite in un terreno di crescita generico per essere sottoposte a varie prove biochimiche quali il test dell'ossidasi, il test di fermentazione/ossidazione degli zuccheri e l'applicazione di un kit miniaturizzato commerciale. Inoltre è importante valutare l'eventuale produzione di pigmenti alla luce solare e UV.

L'utilizzo di kit commerciali permette l'identificazione fenotipica di *routine* di *Pseudomonas* in modo semplice, portando ad un risparmio di tempo e in alcuni casi limitando anche i costi. Il kit più utilizzato è l'API 20 NE (No-Enterobacteriaceae) (Biomèrieux, Lyon - Francia): è un sistema standardizzato che permette l'identificazione di batteri Gram negativi non enterici e “*non fastidious*” grazie alla

combinazione di 8 test convenzionali, 12 test di assimilazione del carbonio e un ricco *database* per l'identificazione finale. Il kit è formato da *strips* composte da 20 microtubi contenenti diversi substrati disidratati ai quali viene aggiunta un'aliquota di sospensione batterica. Durante l'incubazione, nel momento in cui il batterio in esame metabolizza il substrato, avviene un viraggio del colore, in alcuni casi spontaneo, in altri a seguito dell'aggiunta di particolari reagenti.

In base alla positività o negatività di ogni test nei vari microtubi, si risale poi al microrganismo in esame, grazie ad un numero identificativo.

In alternativa al sistema API 20 NE può essere utilizzato il BIOLOG GN, un sistema costituito da 96 pozzetti contenenti diversi composti organici: attraverso la riduzione del tetrazolio, a seguito della respirazione batterica, vi è un viraggio del colore da viola a rosso magenta (Johnsen et al., 1996).

Solitamente la crescita di *Pseudomonas* spp. viene testata su terreni agarizzati differenziali come il *King B agar* o il *King A agar*. Questi due terreni sono stati ideati da King e colleghi nel 1948, quando scoprirono che la produzione di siderofori da parte dei microrganismi dipendeva strettamente dalla composizione del mezzo di coltura. In particolar modo, la produzione di fluoresceina dipendeva dalla presenza nel terreno di ferro, solfato e magnesio. Sono stati dunque ideati i due terreni contenenti potassio, sali di magnesio e glicerolo; al *King A* era stato aggiunto peptone, mentre al *King B* era stato aggiunto *Proteose Peptone*.

Il primo terreno stimola la produzione di piocianina (di colore blu, non fluorescente) e allo stesso tempo inibisce la produzione di fluoresceina: *P. aeruginosa* cresce formando colonie circondate da un alone blu-verde. In molti casi oltre alla piocianina si può apprezzare anche la formazione di pigmenti quali piorubina (colore rosso), pioverdina (verde) o piomelanina (marrone).

Al contrario, il terreno *King B* stimola la produzione di fluoresceina, inibendo la produzione della piocianina. In esso *P. aeruginosa* forma colonie circondate da un alone giallo-verde dato appunto dalla produzione di pigmento. Inoltre, esponendo le colonie alla luce UV, viene emessa fluorescenza. A volte può essere prodotta anche piocianina e vi è il viraggio del colore dell'alone a verde brillante.

E' molto importante tenere in considerazione la temperatura che è determinante per la produzione del pigmento.

1.4 Caratterizzazione di *Pseudomonas*: tecniche di biologia molecolare

Per identificare e caratterizzare il genere è richiesta sia una conoscenza del fenotipo che del genotipo.

Negli ultimi anni hanno preso sempre più piede le tecniche molecolari, grazie anche all'aumento delle prestazioni e all'abbassamento dei costi, che hanno portato ad una caratterizzazione genomica. Inoltre va considerato il fatto che le metodiche di microbiologia classica non danno sempre informazioni approfondite per quanto riguarda l'identificazione di specie, di ceppo o eventuali relazioni filogenetiche.

Attualmente, per quanto riguarda il genere *Pseudomonas*, non vi sono normative specifiche per l'identificazione molecolare nei prodotti alimentari, ma numerosi enti come gli Istituti Zooprofilattici utilizzano approcci molecolari per monitorare la qualità degli alimenti.

Tra gli approcci molecolari che sono stati maggiormente utilizzati abbiamo l'ibridazione DNA-DNA, nella quale vengono utilizzate sonde marcate, il sequenziamento di geni specifici *housekeeping* o il sequenziamento del 5S e 16S per valutare le caratteristiche dell'RNA. In alternativa possono essere determinati il profilo proteico mediante SDS-PAGE o il profilo della composizione lipidica mediante tecnologia MIDI (MIDI Inc., Newark, Delaware – USA), oppure l'analisi dei siderofori, detta *siderotyping*, nella quale si effettua l'isoelettrofocalizzazione dei siderofori (Meyer et al., 2002). Per quanto riguarda le proteine, in uno studio del 2003 è stata messa a punto la MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*), tecnica che permette di identificare i ceppi mediante l'analisi delle proteine ribosomiali (Pineda et al., 2003).

Nel 1996 l'identificazione molecolare di *Pseudomonas* è stata effettuata mediante la metodica REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic-PCR*) che prevedeva l'utilizzo di regioni palindromiche esterne ai geni come *primer* per la reazione di PCR (Johnsen et al., 1996). Dalla reazione di PCR si ottenevano, dopo elettroforesi, delle bande che permettevano di discriminare isolati anche molto simili dal punto di vista filogenetico.

Più recentemente sono stati caratterizzati ceppi di *Pseudomonas* isolati da alimenti mediante RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Franzetti e Scarpellini, 2007): è stato digerito il genoma dei campioni presi in esame grazie ad una coppia di enzimi di restrizione che hanno generato frammenti di diverse dimensioni. In base ai polimorfismi presenti nei siti di taglio per gli enzimi di restrizione, sono stati generati

frammenti di diversa grandezza che a seguito di elettroforesi hanno portato alla formazione di un vero e proprio codice a barre in grado di discriminare i diversi ceppi. Nel 2010 nell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna è stato messo a punto un protocollo PGFE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) per caratterizzare ceppi di *Pseudomonas fluorescens* isolati da prodotti lattiero caseari (Nogarol et al., 2010). Con questa metodica, grazie ad un campo elettrico variabile nel tempo, è possibile ottenere una migliore separazione dell'acido nucleico durante l'elettroforesi.

Attualmente nello stesso IZS viene utilizzata comunemente la ribotipizzazione automatica, metodica analoga alla RFLP, per analizzare i polimorfismi di restrizione degli operoni ribosomiali (Consoli et al., 2010).

Un'altra tecnica molto interessante per l'identificazione di *Pseudomonas* è la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), utilizzata da De Jonghe e colleghi nel 2011, nella quale viene utilizzato un gel con gradiente denaturante che condiziona la migrazione dell'acido nucleico in base alla composizione nucleotidica.

Come detto in precedenza, nonostante sia una delle metodiche largamente più utilizzate, il sequenziamento del gene 16S non porta sempre ad una discriminazione precisa dei ceppi. Per questo motivo ad oggi è sempre più diffuso il *Multilocus Sequence Typing* (MLST) che consente di tipizzare diversi ceppi microbici attraverso l'analisi di alcuni frammenti di geni costitutivi. La caratterizzazione mediante questa tecnica risulta oggettiva, affidabile, trasferibile a una vasta gamma di isolati e in grado di dare informazioni per quanto riguarda la comprensione dell'epidemiologia di focolai di contaminazione (Meiden, 2006).

Solitamente vengono utilizzati 6-8 frammenti di geni *housekeeping* con dimensioni tra 400 e 600 nucleotidi, dove il numero di frammenti da analizzare dipende dal grado di discriminazione che si vuole ottenere.

In genere si scelgono geni molto espressi che codificano per proteine con un elevato grado di "codon-bias", cioè la probabilità che un dato codone venga utilizzato per codificare un amminoacido rispetto ad altri codoni che codificano per lo stesso amminoacido. I geni devono inoltre essere non trasferibili per via orizzontale, dotati di un buon potere discriminante, quindi ampiamente distribuiti nei diversi ceppi del genere preso in esame, e le dimensioni non devono essere limitate, in modo da contenere la maggiore quantità di informazioni possibile, ma al tempo stesso non troppo elevate per poter ottimizzare il sequenziamento.

Con l'individuazione di variazioni genetiche nei diversi *loci*, è possibile definire per ogni *locus* un allele e la combinazione degli alleli darà per ogni ceppo un relativo ST (*Sequence Type*). In questo modo è possibile determinare le relazioni filogenetiche mediante la creazione di un albero filogenetico basato sulle sequenze concatenate di tutti i *loci* genici analizzati per ogni ceppo (concatenamero).

Ad oggi è disponibile *online* un *database* per la tipizzazione molecolare con MLST al sito <http://pubmlst.org/pfluorescens>.

Grazie al MLST sono stati tipizzati altri microrganismi come ad esempio *Oenococcus oeni* (Bilhère et al., 2009), *Listeria innocua* (Chen et al., 2010) o *Bifidobacterium* (Delètoile et al., 2010).

1.5 *Pseudomonas* come patogeno dell'uomo

Pseudomonas è considerato principalmente un agente alterante degli alimenti, tuttavia all'interno di un genere così tanto eterogeneo non possono mancare ceppi in grado di portare patologie nell'uomo.

Il caso più eclatante è rappresentato da *Pseudomonas aeruginosa*, scoperto nel 1872 da Schroeter, che diviene molto virulento soprattutto nei confronti di soggetti immunocompromessi o pazienti ospedalizzati (dove non sono seguite correttamente le norme d'igiene), portando a infezioni localizzate in distretti come polmoni, vie urinarie e occhi, batteriemie ed endocarditi. Il batterio viene riscontrato soprattutto in pazienti affetti da fibrosi cistica, particolarmente suscettibili all'attacco del microrganismo. Le ragioni di tale suscettibilità non sono completamente note, ma in assenza di un trattamento antibiotico la patologia evolve verso la cronicità.

Grazie a numerosi fattori di virulenza, anche all'interno del gruppo *Pseudomonas fluorescens* sono presenti dei ceppi potenzialmente patogeni per l'uomo, infatti la grande adattabilità di *Pseudomonas* fa sì che, nonostante la sua natura psicotrofa, possa comunque colonizzare distretti anatomici dell'uomo (Rossignol et al., 2008). In particolar modo il batterio, come detto in precedenza, è in grado di produrre una grande quantità di enzimi extracellulari quali proteasi, lipasi e fosfolipasi C che possono interferire con le cascate di segnale che partono dalle cellule, modulando la risposta immunitaria dell'ospite o inducendo emolisi; inoltre può legarsi in modo specifico alle membrane citoplasmatiche dei neuroni inducendo apoptosi e necrosi.

Inoltre uno studio abbastanza recente (Gersham et al., 2008) ha mostrato che *P.*

fluorescens può essere presente nella microflora del cavo orofaringeo e può dare infezioni post-trasfusionali e respiratorie nei soggetti immunocompromessi.

Le infezioni sono dunque sempre opportunistiche e colpiscono soggetti debilitati, in più ad oggi non vi sono casi di infezioni dovute al consumo di alimenti contaminati con *Pseudomonadaceae*.

1.6 *Pseudomonas* come agente alterante negli alimenti

L'alterazione degli alimenti è motivo di grande interesse per chi si occupa di igiene degli alimenti, visto il grande impatto economico che può assumere.

I batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* ricoprono un ruolo di primaria importanza per quanto riguarda la degradazione di vari prodotti alimentari, in particolar modo quelli freschi.

Ovviamente la caratteristica di essere ubiquitari e la capacità di crescere alle temperature di refrigerazione giocano un ruolo chiave nell'adattamento del batterio che è così in grado di portare alla contaminazione del prodotto.

Le contaminazioni, per portare a fenomeni alterativi, devono avvenire in un secondo momento rispetto ai trattamenti termici a cui il prodotto alimentare è stato eventualmente sottoposto, vista la grande sensibilità di *Pseudomonas* al calore; tuttavia, spesso l'alterazione avviene in seguito alla morte del batterio ad opera dei numerosi enzimi rilasciati dallo stesso nell'alimento.

E' stato infatti osservato come in alimenti quali latte o prodotti lattiero-caseari, la cui conservazione necessita della catena del freddo, l'alterazione è spesso dovuta ad enzimi idrolitici extracellulari termoresistenti come proteasi, lipasi e lecitinasi (Meer et al., 1991), esattamente quelli di cui *Pseudomonas* è grande produttore.

Il grado di alterazione è diverso in base al tipo di enzima: le proteasi sono in grado di degradare la frazione di caseina nel latte, rappresentata da κ -, α_{s1} - e α_{s2} - e β -caseine, diminuendo la resa della caseificazione (Arslan et al., 2011); inoltre inducono la formazione di sgradevoli sapori, gelatinizzazione del prodotto e la comparsa di colorazioni grigie, non certo apprezzate dai consumatori.

Le proteasi prodotte da *Pseudomonas* appartengono alla classe delle metallo-proteasi e hanno bisogno di Ca^{2+} come cofattore per svolgere l'attività proteolitica, nonché di temperature sui 20°C, infatti la produzione di tali enzimi diminuisce con temperature di refrigerazione e sopra i 30°C. Trattamenti termici a 100°C per 5 minuti portano alla lisi

cellulare dei batteri con successivo rilascio delle proteasi che rimangono stabili, mentre nel caso in cui venga effettuato un trattamento di sterilizzazione per 20 minuti a 121°C, vi è una spiccata riduzione della loro attività (Rajmohan et al., 2002).

Per quanto riguarda le lipasi, esse scindono i trigliceridi idrolizzando il legame tra glicerolo e acidi grassi, causando dunque irrancidimento, saponificazione e portando alla formazione di sapori amari dovuti alla formazione di acidi grassi a catena media. Anche in questo caso la loro produzione è influenzata dalla temperatura: un picco nella loro produzione avviene alle temperature di refrigerazione, come descritto da Rajmohan e colleghi nel 2002.

Infine, le lecitinasi portano ad una degradazione delle membrane dei globuli di grasso del latte, rendendo i grassi più facilmente attaccabili dalle lipasi.

In particolar modo, nel latte crudo possiamo trovare una microflora psicotollerante, dove *Pseudomonas fluorescens* è la specie predominante, che può portare ad un forte deterioramento anche grazie alla capacità di alcuni ceppi di produrre proteasi termoresistenti che idrolizzano la caseina e compromettono la *shelf life* e le qualità organolettiche del latte, che in un secondo momento subisce il trattamento UHT (Sørhaug and Stephaniak, 1997).

Sebbene vi siano alcuni studi in cui la forte attività proteolitica di *Pseudomonas* spp. viene considerata positiva per ridurre il potenziale allergizzante attraverso la scissione di allergeni alimentari come β -lattoglobulina e α -lattoalbumina (Guanhao et al., 2010), possiamo affermare con certezza che si tratta di uno dei maggiori *spoilers* in ambito alimentare.

Un'altra alterazione alimentare di primaria importanza, che negli ultimi tempi ha destato grande interesse, è la produzione di pigmenti, a volte fluorescenti, come carotenoidi o piocianina, che portano all'alimento colorazioni anomale.

I ceppi appartenenti alle *Pseudomonaceae* che sono in grado di produrre tali pigmenti sono *P. fluorescens*, *P. lundensis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. chlororaphis* (Gennari e Dragotto, 1992).

La produzione dei pigmenti fu rilevata per la prima volta dallo studioso M. Dransfiel del dipartimento di Botanica dell'Università di Nottingham (Inghilterra) nel 1956 mentre verificava gli effetti di trattamenti chimici sulle popolazioni fungine del suolo. Andando a piastrare del percolato di suolo sul terreno di coltura *Potato Dextrose Agar* (PDA), vide che tra le colonie fungine vi erano colonie batteriche che avevano prodotto un pigmento inusuale, di colore verde-blu. Le colonie vennero identificate, attraverso i

criteri proposti da Migula, come appartenenti al genere *Pseudomonas* e rispecchiavano le caratteristiche di *P. lemonnieri* descritte nel *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Nel dettaglio, le colonie apparivano lisce, traslucide e biancastre; sul terreno PDA producevano 2 tipi di colorazioni: un pigmento liposolubile, strettamente legato alla cellula batterica, che conferiva una colorazione blu di Prussia particolarmente intensa e fluorescente; e un pigmento verdastro e idrosolubile che diffondeva nel terreno. La pigmentazione blu veniva prodotta solo in condizioni di aerobiosi, a temperature comprese tra 5°C e 26°C e con valori di pH tra 5,0 e 10,0 (Hugo et al., 1956).

Col passare del tempo lo studio sui pigmenti è stato sviluppato a tal punto da capirne meglio l'importanza, infatti risultano implicati nella sopravvivenza cellulare: alcuni hanno proprietà antimicrobiche contro funghi, batteri o lieviti, altri aiutano la cellula quando si trova in condizioni di stress, altri ancora vengono prodotti per assorbire la luce UV o per eliminare i radicali liberi.

Per quanto riguarda la funzione antimicrobica, la famiglia di antibiotici più comunemente sintetizzata dagli pseudomonadi fluorescenti sono le fenazine, tra le quali si trova anche la piocianina. Questi sono dei composti eterociclici contenenti azoto che vengono prodotti durante la fase di crescita stazionaria e, grazie a meccanismi di virulenza, competizione e controllo biologico, proteggono il batterio produttore contro gli altri microrganismi competitori. La piocianina conferisce una colorazione blu e viene comunemente prodotta anche da *P. aeruginosa* durante le infezioni; essendo una molecola zwitterionica è in grado di penetrare facilmente le membrane biologiche.

Altri pigmenti come la pioverdina o la piochelina si comportano invece come siderofori, ovvero dei composti in grado di chelare il ferro, elemento presente nell'ambiente in quantità molto elevate, ma scarsamente disponibile a causa della presenza dell'ossigeno e di condizioni di pH neutro. Infatti il ferro ferroso (Fe^{2+}), ossia la forma disponibile, viene rapidamente ossidato a ferro ferrico (Fe^{3+}) con formazione di ossidi insolubili scarsamente assimilabili, ma grazie alla produzione di siderofori il batterio riesce a legare e inglobare il ferro in modo molto efficiente.

I batteri appartenenti a "*Pseudomonas sensu stricto*" producono dunque questi pigmenti che hanno anche funzione antibatterica e antifungina, privando gli altri microrganismi del ferro presente.

La pioverdina presenta colorazione giallo-verde fluorescente ed è composta da un cromoforo diidrossichinolinico e da un peptide di lunghezza variabile tra i 6 e i 12

amminoacidi. E' un pigmento idrosolubile, infatti è stato estratto con etilacetato da un brodo di coltura (Cox et al., 1985). La piochelina è invece un derivato dell'acido salicilico, viene prodotta in minore quantità rispetto alla pioverdina e ha una minore capacità di complessare il ferro (Mossialos et al., 2000).

La fluorescenza è tipica dei ceppi di *Pseudomonas fluorescens* ed è stata riscontrata in prodotti come latte pastorizzato, formaggi, mozzarelle, carne, insalata e *sushi*.

La capacità di produrre siderofori da parte di *Pseudomonas* è stata sfruttata anche come strategia per il controllo biologico di *Pythium ultimum*, un fungo che causa inumidimento del cotone (Loper, 1988).

I casi più conclamati di colorazioni anomale degli alimenti riguardano prodotti freschi come ad esempio mozzarella, dove ceppi di *Pseudomonas gessardi* sono in grado di portare ad una colorazione multifocale giallo-viola, mentre le colorazioni blu sono da attribuire a *Pseudomonas libanensis*, *Pseudomonas tolasii* o ai ceppi appartenenti a *Pseudomonas fluorescens* biovar IV.

Nel giugno 2010, le autorità italiane hanno riscontrato un problema con l'importazione dalla Germania di mozzarelle che apparivano di colore blu dopo l'apertura delle confezioni in cui erano contenute. A seguito di numerose analisi, nelle cosiddette "mozzarelle blu" è stata riscontrata una quantità molto significativa di *Pseudomonas fluorescens*, pari a $3,3 \times 10^8$ UFC/g, segno evidente di una importante contaminazione lungo la catena produttiva.

I lotti identificati come contaminati erano stati ritirati dal mercato e le autorità tedesche iniziarono le indagini per rilevare le cause di contaminazione.

Nella quasi totalità dei casi, come descritto dall'*Annual Report of RASFF* del 2010, le fonti di contaminazione erano rappresentate dalle acque di processo, ma anche la materia prima, ovvero il latte, dove *Pseudomonas synxantha* può portare a colorazioni gialle generando il cosiddetto "latte giallo". In particolar modo, la colorazione blu riscontrata nei prodotti lattiero-caseari è stata attribuita dal RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) a due specie appartenenti al *P. fluorescens* group: *P. talaasi* e *P. libanensis*.

2. SCOPO DELLA TESI

Data la grande importanza ricoperta dai batteri appartenenti al sottogruppo *Pseudomonas fluorescens* per quanto riguarda l'alterazione degli alimenti, il presente lavoro di tesi ha avuto lo scopo di caratterizzare alcuni ceppi provenienti da matrici alimentari.

Inizialmente i ceppi di campo, presenti nella ceppoteca del laboratorio e già identificati come *P. fluorescens*, oltre a 18 *Type Strain* rappresentativi del *P. fluorescens group*, sono stati caratterizzati dal punto di vista fenotipico per valutarne il potenziale alterante. Inoltre, 3 nuovi ceppi sono stati tipizzati mediante un approccio *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e i risultati ottenuti sono stati integrati con la tipizzazione degli altri ceppi, già effettuata dal gruppo di lavoro della Dott.ssa Barbara Cardazzo, permettendo così di raggruppare i ceppi in in *cluster* filogeneticamente distinti.

Inoltre, sono state correlate le caratteristiche fenotipiche con le informazioni filogenetiche ottenute mediante l'approccio MLST.

Uno dei ceppi tipizzati in questa tesi è stato isolato da pancetta che presentava una colorazione blu ed è stato sottoposto a un *challenge test* su mozzarella per verificare la capacità di produrre il pigmento anche su un alimento diverso rispetto a quello da cui è stato isolato.

Infine, per completare la valutazione del potenziale alterante di una parte dei ceppi inseriti nello studio, è stata valutata, mediante un saggio TNBS (misurazione degli aminoacidi liberi), la capacità proteolitica in latte dopo stress termico, quindi dovuta alla produzione di proteasi termoresistenti (codificate dal gene *aprX*). Parallelamente è stato messo a punto un saggio di *Real Time PCR* in grado di misurare l'espressione genica delle AprX nella matrice latte e correlare così il dato fenotipico con uno di tipo molecolare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento dei ceppi

In questa tesi sono stati utilizzati 18 *Type Strains*, rappresentanti specie diverse del taxon *Pseudomonas fluorescens*, provenienti dalla ceppoteca tedesca DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) e dalla ceppoteca spagnola CECT (*Colección Española de Cultivos Tipo*). Le specie sono state scelte sulla base della ricostruzione filogenetica effettuata da Mulet e colleghi del 2010, in modo da coprire il taxon di interesse con specie sufficientemente diverse tra di loro. I ceppi di referenza utilizzati in questo studio sono riportati nella tabella 3.1.

CEPPO	Codice di riferimento del laboratorio	Specie batterica	Fonte di isolamento
DSM17152T	DSM1	<i>Pseudomonas gessardii</i>	Acqua minerale
DSM15294T	DSM2	<i>Pseudomonas brenneri</i>	Acqua minerale naturale
DSM17967T	DSM3	<i>Pseudomonas mandelii</i>	Acqua minerale
DSM17150T	DSM4	<i>Pseudomonas jessenii</i>	Acqua minerale
DSM16610T	DSM5	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Terreno agricolo
DSM17489T	DSM6	<i>Pseudomonas orientalis</i>	Acqua di sorgente
DSM18928T	DSM7	<i>Pseudomonas synxantha</i>	Panna
DSM18862T	DSM8	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	Risaie
DSM6252T	DSM9	<i>Pseudomonas lundensis</i>	Carne di manzo
DSM14020T	DSM10	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Acqua minerale naturale
DSM11331T	DSM11	<i>Pseudomonas veronii</i>	Acqua minerale
DSM17149T	DSM12	<i>Pseudomonas libanensis</i>	Acqua di sorgente
DSM50415	DSM13	<i>Pseudomonas lemonnieri</i>	Terreno
CECT124T	CECT1	<i>Pseudomonas corrugata</i>	Pomodoro
CECT229T	CECT2	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Indivia
CECT378T	CECT3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Serbatoi di pre-filtro
CECT446T	CECT4	<i>Pseudomonas fragi</i>	Informazione non disponibile
CECT4470T	CECT5	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Piastra contaminata

Tabella 3.1: ceppi di referenza utilizzati nel presente studio. In tabella sono riportati il codice alfanumerico del ceppo, il codice di riferimento utilizzato in laboratorio, la specie e la fonte di isolamento.

Inoltre sono stati presi in esame 79 ceppi di *Pseudomonas* spp., isolati ed identificati nei laboratori presso: il Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione, l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, il Dipartimento di Scienze degli Alimenti di Udine e la *School of Veterinary Science* presso l'Università di Bristol.

Nella tabella 3.2 sono stati riportati il codice di riferimento usato in laboratorio, la fonte dalla quale è stato isolato il ceppo e la provenienza.

CEPPO	Codice di riferimento del laboratorio	Fonte di isolamento	Provenienza
18	ps_1	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
22	ps_2	Mozzarella	IZS Venezie - Germania
23	ps_3	Mozzarella	IZS Venezie - Italia
31	ps_4	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
52	ps_5	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
57	ps_6	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
61	ps_7	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
77	ps_8	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
84	ps_9	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
92	ps_10	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
95	ps_11	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
98	ps_12	Mozzarella	IZS Venezie - Germania
100	ps_13	Mozzarella	IZS Venezie - Germania
139	ps_14	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
3bol	ps_15	Trota marmorata	IZS Venezie - NE Italia
6bol	ps_16	Trota fario	IZS Venezie - NE Italia
33Ae	ps_17	Ricotta	IZS Venezie - NE Italia
L2-2	ps_18	Latte UHT	Udine - Italia
L3-1	ps_19	Latte UHT	Udine - Italia
L3-4	ps_20	Latte UHT	Udine - Italia
MOZ2	ps_21	Mozzarella	Udine - Italia
MOZ3	ps_22	Mozzarella	Udine - Italia
MOZ5	ps_23	Mozzarella	Udine - Italia
PISA 3	ps_24	Formaggio	IZS Toscana - C Italia
PISA 4	ps_25	Latte UHT	IZS Toscana - C Italia
H6Ae	ps_26	Caso di infezione umano	Udine - Italia

CEPPO	Codice di riferimento del laboratorio	Fonte di isolamento	Provenienza
602a	ps_27	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602b	ps_28	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602c	ps_29	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602d	ps_30	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602e	ps_31	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602f	ps_32	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602h	ps_33	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602i	ps_34	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602l	ps_35	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602m	ps_36	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602qc	ps_37	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602qi	ps_38	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
602r	ps_39	Insalata " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
603g	ps_40	Ricotta	BCA - NE Italia
Pse11	ps_41	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse12	ps_42	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse13	ps_43	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse15	ps_44	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse16	ps_45	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse19	ps_46	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse21	ps_47	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse24	ps_48	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse26	ps_49	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse29	ps_50	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse30	ps_51	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse38	ps_52	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse39	ps_53	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse44	ps_54	Carne di maiale	BCA - NE Italia
Pse46	ps_55	Carne di maiale	BCA - NE Italia
761 5	ps_56	Sashimi	BCA - NE Italia
762 1	ps_57	Sashimi	BCA - NE Italia

CEPPO	Codice di riferimento del laboratorio	Fonte di isolamento	Provenienza
762 2	ps_58	Sashimi	BCA - NE Italia
762 3	ps_59	Sashimi	BCA - NE Italia
762 5	ps_60	Sashimi	BCA - NE Italia
763 1	ps_61	Sashimi	BCA - NE Italia
763 2	ps_62	Sashimi	BCA - NE Italia
763 3	ps_63	Sashimi	BCA - NE Italia
763 4	ps_64	Sashimi	BCA - NE Italia
815b	ps_65	Rucola " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
815 m	ps_66	Rucola " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
816d	ps_67	Rucola " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
816o	ps_68	Rucola " <i>Ready-to-Eat</i> "	BCA - NE Italia
Pse48	ps_69	Prodotto lattiero-caseario	Udine - Italia
Pse49	ps_70	Prodotto lattiero-caseario	Udine - Italia
Pse50	ps_71	Latte UHT	Udine - Italia
Pse51	ps_72	Prodotto lattiero-caseario	Udine - Italia
Pse52	ps_73	Prodotto lattiero-caseario	Udine - Italia
Pse54	ps_74	Prodotto lattiero-caseario	Udine - Italia
62	ps_75	Mozzarella	IZS Venezie - NE Italia
PISA 1	ps_76	Mozzarella	IZS Toscana - C Italia
Uk1	ps_77	Carne di manzo	Bristol - Inghilterra
Uk4	ps_78	Mozzarella	Bristol - Inghilterra
BB	ps_79	Carne di maiale	BCA - NE Italia

Tabella 3.2: ceppi utilizzati nel presente studio. In tabella sono riportati il codice identificativo del ceppo e la fonte di isolamento. L'asterisco (*) indica le matrici alimentari che presentavano una colorazione blu. Nella colonna provenienza le sigle NE e C, indicano rispettivamente NordEst e Centro Italia.

L'isolamento dei ceppi è stato effettuato sul terreno selettivo e differenziale *Pseudomonas Agar Base (PAB)* addizionato con *CFC Pseudomonas Supplement*. In questo terreno vi sono idrolizzato di caseina e peptone di gelatina come fonti carboniose e sali come cloruro di magnesio e solfato di potassio che promuovono la formazione del pigmento piocianina che porta alla colorazione verde-blu attorno alle colonie. Va ricordato che è presente anche glicerolo che costituisce una fonte di energia importante

anche per la produzione del pigmento. Grazie al supplemento CFC (cetramide, fucidina e cefaloridina) viene inibita la crescita di microrganismi Gram positivi e Gram negativi, eccetto quelli del genere *Pseudomonas*.

In seguito è stato effettuato, sotto cappa microbiologica a flusso laminare orizzontale, il riconoscimento delle colonie di *Pseudomonas* anche grazie all'ausilio di una lampada UV. *Pseudomonas* infatti produce dei siderofori che emettono una fluorescenza giallo-verde, ben visibile esponendo le colonie ai raggi UV.

3.2 Isolamento di ceppi di *Pseudomonas* da pancetta

Nel presente studio è stato analizzato un campione di pancetta, proveniente da un salumificio trevigiano, che presentava una anomala colorazione blu.

La comparsa della colorazione anomala avveniva in un periodo di tempo di 4 giorni: dopo la macellazione, al suino pesante veniva operato un taglio a caldo e le mezzene venivano tenute una notte in cella prima di effettuare il disosso. Il giorno seguente la pancetta veniva rifilata dalla mezzena e scotennata per poi essere posta in ambiente refrigerato e inviata al salumificio dove veniva stoccata per 2-3 giorni prima di essere utilizzata per aumentare la quota di grasso all'interno dei salumi. La pancetta dopo il periodo di stoccaggio presentava la colorazione blu, probabilmente a causa di abusi temici. Il fenomeno avveniva con frequenza maggiore nel periodo primaverile.

Nel nostro laboratorio la pancetta è stata manipolata su bancone precedentemente sterilizzato con detergenti e l'ambiente è stato reso sterile grazie all'ausilio del bunsen.

E' stato eseguito un prelievo con un'ansa sterile e i batteri sono stati piastrati sui terreni di coltura *Potato Dextrose Agar* (PDA; Biokar Diagnostic, Beauvais, FR), *Oxytetracycline Glucose Agar* (OGA; Biokar Diagnostic, Beauvais, FR), *Tryptic Soy Agar* (TSA; Biokar Diagnostic, Beauvais, FR) e CFC PAB (Biolife Italiana, Milano, IT). In particolar modo, il terreno OGA è stato utilizzato per determinare se la colorazione blu della pancetta fosse dovuta a lieviti o muffe, infatti il terreno è specifico per questo tipo di microrganismi.

E' stato inoltre effettuato un altro prelievo con un tampone, il quale è stato posto in 10ml di brodo *Maximum Recovery Diluent* (MRD); sono state effettuate delle diluizioni seriali, da tale brodo fino alla -7, che sono poi state piastrate sugli stessi terreni utilizzati in precedenza. Tutte le piastre sono poi state incubate a 22°C e la crescita batterica è stata monitorata per alcuni giorni.

Le colonie ritenute interessanti sono state poste nuovamente in CFC per confermare la positività come *Pseudomonas*.

La composizione dei terreni è riportata nella tabella 3.3.

Terreno	Composizione
<i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	4 g/L di estratto di patata; 20 g/L di destrosio; 15 g/L di agar
<i>Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)</i>	5g/L di estratto di lievito; 20 g/L di glucosio; 0,1 g/L di Oxytetraciclina; 15 g/L di agar
<i>Tryptic Soy Agar (TSA)</i>	17 g/L di Triptone; 3 g/L di Peptone di soia; 5 g/L di Sodio cloruro; 2,5 g/L di Dipotassio fosfato; 2,5 g/L di Glucosio; 1,5 g/L di Sali biliari n°3; 20 mg/L di Novobiocina; 1,5 % di agar
<i>Maximun Recovery Diluent (MRD)</i>	1 g/L di Peptone universale; 8,5 g/L di Sodio cloruro

Tabella 3.3: terreni di coltura, con relativa composizione, utilizzati per l'isolamento dei ceppi da pancetta.

3.3 Amplificazione della regione 16S dei ceppi isolati da pancetta mediante metodica PCR

La tecnica di PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ideata da K. B. Mullis nel 1985, viene utilizzata per ricostruire in vitro il fenomeno di replicazione del DNA, utilizzando i seguenti reagenti:

- Una coppia di *primer* (*forward* per l'estremità 5' e *reverse* per l'estremità 3');
- La *Taq polimerasi*, ottenuta dal batterio termale *Thermus aquaticus*, che catalizza la reazione di polimerizzazione delle molecole di DNA *ex novo* ed è in grado di resistere alle elevate temperature di denaturazione del DNA (95°C);
- Nucleotidi (dNTPs o deossiribonucleotidi trifosfati);
- Ione Mg²⁺ per stabilizzare l'attività della *Taq polimerasi*;
- Un tampone di reazione per il mantenimento delle condizioni ottimali di pH e forza ionica di reazione.

La reazione di PCR avviene in un numero di cicli compreso tra 25 e 35, ognuno dei

quali caratterizzato dalle seguenti fasi:

1. Denaturazione: alla temperatura di 94-95°C avviene l'apertura della doppia elica di DNA e le due catene nucleotidiche si separano;
2. *Annealing*: i *primer* si legano al filamento stampo di DNA. La temperatura varia in base alla composizione nucleotidica dell'innesco;
3. Allungamento: a 72°C la *Taq polimerasi* catalizza la formazione del nuovo filamento, complementare a quello stampo.

Nel presente studio sono stati utilizzati i *primer* 16S_Bact331F e 16S_Bact798R, presenti in letteratura (Nadkarni et al., 2002) e riportati in tabella 3.4.

<i>Primer</i>	Sequenza (5'→3')	T _m (°C)
16S_Bact331F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT (19)	61,0
16S_Bact798R	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT (22)	58,4

Tabella 3.4: *primer* utilizzati per l'amplificazione della regione 16S dell'rRNA con relativa sequenza e temperatura di *melting*.

Il DNA genomico dei ceppi isolati da pancetta è stato ottenuto mediante bollitura: una colonia batterica è stata prelevata con un'ansa sterile ed è stata stemperata in 100 µl di acqua BDH. La sospensione batterica è stata dunque portata ad ebollizione mediante un termoblocco per 10 minuti e successivamente è stata centrifugata a 14000 rpm per 2 minuti. Il surnatante contenente il DNA è stato infine prelevato, diluito 1:100 in acqua BDH e conservato a -20°C.

La miscela di reazione, del volume finale di 20 µl, era così composta:

- 4 µl di *Buffer* di reazione 5X;
- 2 µl di MgCl₂ 25 mM;
- 0,112 µl di dNTPs 25µM;
- 0,25 µl di *primer* 16S_Bact331F;
- 0,25 µl di *primer* 16S_Bact798R;
- 0,1 µl di *Taq polimerasi* 5 U/µl;
- 2,5 µl di DNA [circa 10 ng];
- 10,78 µl di H₂O BDH.

Nella reazione è stato utilizzato l'enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega

Corporation, Madison, USA), posto all'interno del *buffer* di reazione (*GoTaq[®] Flexi Buffer*) fornito dal kit commerciale.

I campioni di DNA sono stati amplificati mediante il termociclatore Euroclone CELBIO (Euroclone[®], Pero, Milano, IT) e il protocollo termico prevedeva le seguenti fasi:

Attivazione della <i>Taq</i> polimerasi	94°C per 2 minuti	} 35 cicli
Denaturazione	94°C per 20 secondi	
Annealing	60°C per 30 secondi	
Allungamento	72°C per 1 minuto	
Estensione finale	72°C per 7 minuti	

In seguito è stata eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% per osservare la corretta amplificazione.

3.4 Sequenziamento dei prodotti PCR

Il sequenziamento dei frammenti amplificati è avvenuto presso MacroGen EU (Meibergdreef, Amsterdam, The Netherlands) dove è stato utilizzato il metodo Sanger. Questo metodo si basa sull'utilizzo di nucleotidi modificati (nucleotidi dideossitriofosfato, ddNTPs) che portano all'interruzione della reazione di sintesi. Questi sono uguali ai nucleotidi normali, eccetto per la presenza all'estremità 3' di un gruppo idrogeno al posto del gruppo ossidrilico (-OH) che rende impossibile l'aggiunta di altri nucleotidi.

La polimerizzazione avviene ad opera della *DNA polimerasi* a partire dal *primer* usato come innesco e nella miscela di reazione sono presenti i nucleotidi classici (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e i ddNTPs che vengono marcati per fluorescenza (i 4 ddNTPs vengono marcati con fluorofori diversi per essere successivamente discriminati l'uno dall'altro).

Prima di essere sequenziato, il DNA viene denaturato in singolo filamento e, dopo l'appaiamento del *primer*, vengono incorporati in modo casuale i nucleotidi (dNTPs o ddNTPs).

L'amplificazione permette così la creazione di frammenti di diversa lunghezza, dove il ddNTP finale viene discriminato da un laser. Come risultato si ottiene un

cromatogramma, ovvero un diagramma formato da picchi di quattro colori diversi, ognuno dei quali raffigurante un diverso nucleotide nella propria posizione all'interno della sequenza.

Per ogni campione è stata eseguita la reazione di sequenziamento utilizzando il *primer forward* 16S_Bact331F, confermando la sequenza mediante un secondo sequenziamento del prodotto di PCR con il *primer reverse* 16S_Bact798R.

3.5 Analisi bioinformatiche delle sequenze ottenute

3.5.1 Finch TV

I cromatogrammi ottenuti dal sequenziamento sono stati analizzati mediante il *software* bioinformatico FinchTV (Geospiza Inc., North Tower, Seattle). Con questo programma è possibile controllare la corretta assegnazione delle basi e quindi modificare manualmente la sequenza per poi ottenerla in formato FASTA, utilizzato per le analisi seguenti.

Il formato FASTA presenta il segno di maggiore (>) a monte del nome della sequenza, la quale viene riportata nella riga seguente e non deve presentare spaziature.

3.5.2 BLAST

L'attribuzione di specie dei ceppi isolati da pancetta, a partire dalle sequenze nucleotidiche, è avvenuto mediante il *software online* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), un programma euristico per la ricerca di omologie locali di sequenza. In particolar modo è stato utilizzato lo strumento *tblastn* che paragona la sequenza nucleotidica di interesse ad un *database* di sequenze nucleotidiche.

3.6 Valutazione di caratteri fenotipici dei ceppi di *P. fluorescens*

Per tutti i ceppi campionati, ad eccezione di alcuni non presenti nella ceppoteca del laboratorio, sono state valutate caratteristiche fenotipiche come la produzione di pigmentazione e/o fluorescenza e la capacità di deterioramento degli alimenti attraverso la produzione di enzimi come proteasi, fosfolipasi C e lipasi.

Inizialmente i campioni, conservati in *microbank* o provette contenenti brodo TSB e

glicerolo, sono stati rivitalizzati in 3 ml di *Tryptic Soy Broth* (TSB; Biokar Diagnostic, Beauvais, FR) [17 g/L *Tryptone Bacto* (digerito pancreatico di caseina); 3 g/L *Soytone Bacto* (digerito peptico di farina di soia); 2,5 g/L Glucosio; 5 g/L Cloruro di sodio; 2,5 g/L Fosfato d'idrogeno di potassio]. I ceppi sono stati poi incubati in termostato a 22°C per 48 ore per ottenere una concentrazione di circa 10⁸ UFC/ml.

Mediante delle diluizioni seriali in TSB è stata in seguito ottenuta la concentrazione di 10⁵ UFC/ml, ritenuta la concentrazione ottimale per effettuare la semina in piastra (Martin et al., 2011).

I ceppi sono stati dunque seminati in 4 diversi terreni, riportati nella tabella 3.5.

Terreno	Composizione
<i>Pseudomonas Agar Base (PAB)</i>	10 g/L idrolizzato di caseina; 16 g/L peptone di gelatina; 1,4 g/L di cloruro di magnesio; 10 g/L di solfato di potassio; 15 g/L agar
<i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	4 g/L di estratto di patata; 20 g/L di destrosio; 15 g/L di agar
<i>Nutrient Agar (NA) con latte</i>	2 g/L di estratto di lievito; 5 g/L di peptone; 5 g/L di cloruro di sodio; 15 g/L di agar; 2% latte UHT
<i>Egg Yolk Agar (EYA)</i>	20 g/L di digerito pancreatico di caseina; 5 g/L di estratto di lievito; 0,5 g/L di piruvato; 2,5 g/L di cloruro di sodio; 2 g/L di destrosio; 0,2 g di L-triptofano; 1 ml di Tween 80; 1 ml vitamina K1; 0,4 g di L-cisteina; 5 g di sodio fosfato; 0,2 ml di solfato di magnesio concentrato al 5%; 20 g/L di agar

Tabella 3.5: Elenco dei terreni utilizzati per la caratterizzazione fenotipica con relativa composizione.

Il terreno PAB (Biolife Italiana, Milano, IT), che non ha richiesto l'aggiunta di antibiotici in quanto sono stati utilizzati ceppi puri e conservati in *microbank*; e il terreno PDA (Oxoid Limited, Hampshire, UK) sono stati utilizzati per valutare la pigmentazione delle colonie (colore e intensità) e per visualizzare l'eventuale emissione di fluorescenza a seguito della stimolazione con raggi UV (Johnsen et al., 1996). I terreni NA (Biokar Diagnostic, Beauvais, FR) e EYA (Anaerobe System, Morgan Hill, California, USA) sono stati utili per analizzare la produzione enzimatica: nel primo terreno è stata valutata l'attività proteolitica a carico delle caseine presenti nel latte

aggiunto al terreno (Marchand et al., 2009), mentre nel secondo sono state valutate proteolisi, lipolisi e attività delle lecitinasi (Rossignol et al., 2009).

Le piastre Petri sono state successivamente incubate a tre diverse temperature: 6°C, 22°C e 31°C; è stata effettuata l'osservazione delle stesse a 3, 7 e 10 giorni, annotando di volta in volta le caratteristiche fenotipiche osservate. Per quanto riguarda l'emissione di fluorescenza, questa è stata in un primo momento saggiata con una lampada di Wood e il risultato è stato confermato con lo strumento Gel Doc XR™ (Biorad, Hercules, California, USA) che esponeva le colonie ad una radiazione ultravioletta alla lunghezza d'onda di 302 nm.

Nel terreno NA con latte, l'idrolisi delle proteine viene comunemente visualizzata grazie ad un alone di chiarificazione attorno alle colonie; nel terreno EYA si possono invece apprezzare l'alone di chiarificazione attorno alle colonie (proteolisi), la formazione di un velo traslucido sulla superficie delle colonie (lipolisi) e la formazione di un alone biancastro (attività lecitinasica).

Tutti i caratteri osservati sono stati annotati assegnando negatività 0, nel caso di positività, il grado da 1 a 3. La colorazione è stata presa in considerazione solo nel caso in cui il pigmento diffondesse nel terreno e non rappresentasse la colorazione intrinseca della colonia.

3.7 Software R

I dati fenotipici sono stati sottoposti ad un'analisi statistica, condotta dal Dott. Luca Fasolato: è stata effettuata una *cluster analysis* di tipo gerarchico aggregativo mediante il *software R* (<http://www.r-project.org/>), utilizzando il pacchetto *Cluster* e la procedura *Daisy*.

Nell'analisi sono state utilizzate le variabili legate alla produzione degli enzimi alle tre differenti temperature e considerando al contempo anche il grado di intensità enzimatica.

E' stato impiegato l'indice di dissomiglianza di Gower (Gower, 1971) che considera variabili binarie, ordinali e qualitative.

Come risultato finale è stato ottenuto un dendrogramma dove sono stati individuati dei *cluster* fenotipici seguendo il metodo proposto da Goncalves e colleghi nel 2008 (Gonçalves et al., 2008).

3.8 Challenge test su mozzarella

Sono stati eseguiti dei *challenge test* al fine di verificare se i ceppi isolati da pancetta fossero in grado di produrre il pigmento blu su campioni di mozzarella. Dopo aver eseguito un preinoculo in 3 ml di brodo TSB per 48 ore, la concentrazione batterica era di 10^8 UFC/ml. Sono state dunque eseguite delle diluizioni seriali fino alla concentrazione di 10^5 UFC/ml. Da questa diluizione sono stati prelevati 5 ml che sono stati posti in un sacchetto per *Stomacher* sterile contenente 45 ml di liquido di governo delle mozzarelle. Infine, all'interno del sacchetto è stata posta una mozzarella “*cherry size*”.

Tutte le operazioni sono state svolte sotto cappa microbiologica a flusso laminare orizzontale.

Infine le mozzarelle sono state poste a 5°C e sono state osservate per alcuni giorni fino all'ottenimento della colorazione blu.

3.9 Metodica di PCR per l'esecuzione del *Multilocus Sequence Typing*

In questo studio, sono state amplificate, mediante la tecnica di PCR, le porzioni di sette diversi *loci* del genoma di *Pseudomonas*:

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

Per la loro amplificazione sono state utilizzate sette coppie di *primer*, disegnate e testate dal gruppo di ricerca della Dottoressa Barbara Cardazzo, riportate nella tabella 3.6.

<i>Primer</i>	Sequenza	Dimensioni amplicone	T_m (°C)
<i>glnS</i>	ACCAACCCGGCCAAGAAGACCAGG(24) TGCTTGAGCTTGCGCTTG(18)	710 bp	64,7 56,0
<i>gyrB</i>	GGTGGTCGATAACTCCATCG(20) CGCTGAGGAATGTTGTTGGT(20)	704 bp	59,4 57,3
<i>ileS</i>	TCCCCAATGAARGCCGGCCTGCC(23) GGGGTGGTGGTCCAGATCACG(21)	633 bp	66,9 65,7
<i>nuoD</i>	GAAGTCCTGACCTTCCTGC(19) GAAGAACTCGGCCATCATG(19)	771 bp	59,9 59,7
<i>recA</i>	TGGCTGCGGCCCTGGGTCAGATC(23) ACCAGGCAGTTGGCGTTCCTTGAT(23)	573 bp	69,6 62,4
<i>rpoB</i>	TGGCCGGTCGTCACGGTAACA(21) CCGAAACGCTGACCACCGAAC(21)	610 bp	64,8 64,3
<i>rpoD</i>	CTGATCCAGGAAGGCAACATCGG(23) ACTCGTCGAGGAAGGAGCG(19)	631 bp	64,5 65,6

Tabella 3.6: *primer* utilizzati per amplificare i frammenti genomici di *Pseudomonas* per effettuare il MLST. In tabella sono riportate la sequenza, le dimensioni dell'amplicone e le temperature di *melting*.

Come stampo è stato utilizzato il DNA genomico dei ceppi ps_77, ps_78 e ps_79 che è stato ottenuto mediante bollitura, come spiegato nel paragrafo 3.3.

La miscela di reazione per effettuare la PCR, del volume finale di 20 µl, era così composta:

- 4 µl di *Buffer* di reazione 5X;
- 2 µl di MgCl₂ 25 mM;
- 0,112 µl di dNTPs 25 µM;
- 0,25 µl di *primer forward*;
- 0,25 µl di *primer reverse*;
- 0,1 µl di *Taq polimerasi* 5 U/µl;
- 2,5 µl di DNA [circa 10 ng];
- 10,78 µl di H₂O BDH.

Anche in questa reazione PCR è stato utilizzato l'enzima *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega Corporation, Madison, USA), posto all'interno dell'apposito *buffer* di reazione (*GoTaq® Flexi Buffer*).

I campioni sono stati amplificati mediante il termociclatore Euroclone CELBIO e il

protocollo termico prevedeva le seguenti fasi:

Attivazione della <i>Taq</i> polimerasi	94 °C per 2 minuti	} 35 cicli
Denaturazione	94 °C per 20 secondi	
Annealing	60 °C per 30 secondi	
Allungamento	72 °C per 1 minuto	
Estensione finale	72 °C per 7 minuti	

In seguito è stata eseguita una corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% per osservare la corretta amplificazione.

3.10 Sequenziamento dei prodotti PCR

Il sequenziamento dei frammenti genici è stato effettuato da MacroGen EU (Meibergdreef, Amsterdam, The Netherlands) utilizzando il metodo Sanger, descritto in precedenza nel paragrafo 3.4.

Per ogni campione sono state eseguite due PCR di sequenza, una con il *primer forward* e una con quello *reverse*, in modo da ottenere una sequenza complementare di conferma.

3.11 Analisi bioinformatiche - Finch TV e allineamento delle sequenze *FOR* e *REV*

I cromatogrammi ottenuti dal sequenziamento sono stati analizzati mediante il *software* bioinformatico FinchTV, descritto nel paragrafo 3.5.1.

Per fare l'allineamento delle sequenze è stato utilizzato il *software online* ClustalW, in modo da verificare il grado di omologia tra le due diverse sequenze (*FOR* e *REV*) disponibili per ogni campione. Questo programma produce allineamenti multipli di sequenze divergenti di acidi nucleici e/o proteine e le allinea visualizzandone le identità e le differenze; il tutto è basato su un algoritmo che sfrutta un metodo di allineamento euristico progressivo. Il *software* va in un primo momento ad allineare le sequenze a coppie, ne calcola le distanze filogenetiche e identifica un albero approssimativo con il

metodo *Neighbour-Joining*. L'*output* del programma mostra un multiallineamento dove un asterisco (*) indica i nucleotidi conservati tra le sequenze.

Le sequenze nucleotidiche di ognuno dei geni amplificati sono state in seguito tagliate in frammenti di dimensioni uguali e corrispondenti alla medesima regione genica. Dopo averle poste in formato FASTA, le sequenze di ogni gene, in direzione 5'→3', sono state unite in ordine alfabetico in un'unica sequenza, detta concatenamero.

Per le successive analisi, oltre ai concatenameri ottenuti, sono stati utilizzati anche le corrispondenti regioni geniche di microrganismi completamente sequenziati quali *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (AM_181176), *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (CP_000094), *Pseudomonas fluorescens* Pf5 (CP_000076), *Pseudomonas brassicacearum* (CP_002585), *Pseudomonas fluorescens* A506 (CP_003041) e *Pseudomonas fluorescens* F113 (CP_003150).

3.12 Analisi filogenetiche

3.12.1 Identificazione dei *Sequence Type*

L'identificazione dei *Sequence Type* (ST) è avvenuta mediante il *software online* Datamonkey che permette di effettuare uno *screening* di allineamenti di sequenze omologhe.

In questo caso il *software* è stato utilizzato per evidenziare le sequenze con totale omologia, alle quali è stato assegnato lo stesso ST.

3.12.2 DnaSP

Dopo aver identificato i ST, le sequenze allineate sono state sottoposte al *software* DnaSP (*DNA Sequence Polymorphism*) che permette l'analisi di polimorfismi nucleotidici ed è in grado di stimare le variazioni all'interno o tra popolazioni, parametri di *gene convention*, *linkage disequilibrium*, flusso genico e ricombinazione.

In questo studio è stata valutata la percentuale di G-C presente nelle sequenze dei singoli *loci* e dei concatenameri, il numero di polimorfismi e dei siti informativi della parsimonia, il tasso di mutazioni sinonime e non sinonime, i valori Θ (numero medio di differenze nucleotidiche per sito) e π (diversità nucleotidica per sito) e il valore D del test di Tajima. Con il *D-test* di Tajima, la deviazione dell'ipotesi della neutralità viene

ottenuta confrontando la media delle differenze nucleotidiche a coppie tra le sequenze con il numero di siti segreganti (numero delle posizioni nucleotidiche in cui viene riscontrato un polimorfismo). La popolazione è in equilibrio mutazionale neutrale quando il valore D è uguale a 0 e quindi gli incroci sono avvenuti in modo casuale (*random mating*), mentre con valori compresi tra 2 e -2 si ottengono dati significativi.

3.12.3 PhyML

Per la creazione di alberi di tipo *Maximum Likelihood* può essere utilizzato il *software* bioinformatico PhyML.

Per ottenere questo albero filogenetico, il programma va a calcolare la probabilità che l'allineamento osservato si sia verificato con un determinato modello di evoluzione precedentemente scelto. Partendo da un primo albero, il *software* esplora tutte le possibili relazioni filogenetiche per identificare l'albero *Maximum Likelihood*.

In questo caso per ottenere l'albero sono state utilizzate le impostazioni di *default* mediante l'applicazione "One-click" che utilizza l'algoritmo *Maximum Likelihood*.

3.13 Analisi bioinformatiche per la ricerca e l'utilizzo delle sequenze di AprX

3.13.1 Ricerca di proteasi termoresistenti (AprX) nei vari genomi completi di *Pseudomonas fluorescens* disponibili online

Partendo da un lavoro di S. Marchand (Marchand et al., 2009) in cui veniva illustrata la capacità dei batteri del genere *Pseudomonas* di secernere proteasi termoresistenti (AprX) in grado di portare alla degradazione del latte UHT, è stata condotta una ricerca *online* della proteasi AprX nei vari genomi disponibili su GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank).

Le sequenze sono state annotate e successivamente allineate.

3.13.2 Allineamento delle sequenze delle AprX e creazione dell'albero filogenetico

Le sequenze nucleotidiche delle AprX ottenute *online* sono state tradotte per mezzo del *software online* EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/), ponendo le sequenze

nel corretto *frame* di lettura ed eliminando i codoni di stop, ottenendo così la composizione amminoacidica. Le sequenze sono state inoltre poste in formato FASTA. L'allineamento è stato eseguito con il *software online* ClustalW ed è avvenuto sia per le sequenze nucleotidiche, che per quelle proteiche.

Per la creazione dell'albero filogenetico è stato usato il programma PhyML e il *software* è stato utilizzato usando le impostazioni di *default* mediante l'applicazione "One-Click" che esplora tutte le possibili relazioni filogenetiche e porta all'identificazione dell'albero *Maximum Likelihood*.

3.13.3 Disegno di *primer* specifici per il gene *aprX*

Per effettuare l'amplificazione delle sequenze *aprX* dei ceppi di referenza (Tab. 3.1), sono state disegnate alcune coppie di *primer* mediante il *software* PriFi che permette il disegno di *primer* degenerati. Questi non prevedono una sequenza univoca, ma contengono una o più posizioni in cui possono essere presenti diversi nucleotidi in miscela. Le "degenerazioni" vengono indicate con alcune lettere come ad esempio N (contengono in miscela le basi T + C), Y (contengono in miscela i nucleotidi A + G + C + T) o R (miscela con A + G). Grazie a questi particolari *primer* si aumenta la possibilità di appaiamento a sequenze diverse tra loro, tuttavia si riduce la specificità. Inoltre va tenuto in considerazione che le degenerazioni vanno preferibilmente poste verso il 5' della sequenza del *primer*, in quanto la *DNA polimerasi* si ancora al 3' per portare all'amplificazione e la presenza di degenerazioni potrebbe indurre errori di scrittura.

Come parametri generali è bene ricordare che per una buona amplificazione la presenza di G e C deve essere tra il 40 e il 60% (Guanina e Citosina si legano tra di loro con un triplo legame e quindi l'appaiamento tra *primer* e DNA risulta più stabile), la lunghezza delle sequenze è bene che sia compresa tra 18 e 25 basi e le temperature di *melting* (temperatura alla quale il 50% delle molecole di DNA si trova in forma di doppia elica stabile e il 50% come singola elica) dei due *primer* deve essere la stessa o molto simile. Inoltre risulta evidente che i *primer* non devono essere complementari tra di loro per limitare la formazione di dimeri; vanno anche evitati *primer* con sequenze palindromiche e con strutture secondarie estese.

Come temperatura di *melting* è stato scelto di operare in un *range* compreso tra 55°C e 65°C, mentre la lunghezza dei *primer* era compresa tra 18 e 25 basi e l'intervallo di

lunghezza della sequenza da amplificare è stato impostato tra 300 e 600 nucleotidi. I *primer* che sono stati disegnati sono riportati nella tabella 3.7; inoltre è stato utilizzato anche un *forward* specifico per le *aprX*, già presente in letteratura (Marchand et al., 2009).

<i>Primer</i>	Sequenza (5'→3')	T _m (°C)
Pse_AprXF1	CAGACCCTGACCCACGARATCGG (23)	66,9
Pse_AprXR1	TGAGGTTGATCTTCTGGTTCTGGG (24)	62,7
Pse_AprXF2	CACATGACCTTCGGCAACTACAGC (24)	64,4
Pse_AprXR2	GTTGGCACCGTAGAGCTTCTGG (22)	64,0
Pse_AprX2F3	ACCCTGACCCACGAAATCGGCC (22)	65,8
Pse_AprX2R3	GCGATGGACACGTTGCCAC (20)	63,5
Pse_AprX_sm2F	CAAATCGATAGCTTCAGCCA (20)	55,3

Tabella 3.7: *primer* disegnati per l'amplificazione delle sequenze *aprX*, con relativa sequenza e temperatura di *melting*.

3.14 PCR *end point* e scelta della coppia di *primer*

L'amplificazione delle sequenze *aprX* presenti nel genoma dei ceppi di referenza di *Pseudomonas fluorescens* è avvenuta grazie alla metodica di PCR con la quale, in un primo momento, sono state testate le diverse coppie di *primer* per verificare la migliore combinazione possibile che permettesse una corretta amplificazione e potesse limitare la formazione di aspecifici. Sono state utilizzate diverse combinazioni di *primer*, come riportato nella tabella 3.8.

Combinazione	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Dimensioni amplicone
1	Pse_AprXF1	Pse_AprXR1	365 bp
2	Pse_AprXF2	Pse_AprXR2	400 bp
3	Pse_AprX2F3	Pse_AprX2R3	464 bp
4	Pse_AprX_sm2F	Pse_AprXR1	888 bp
5	Pse_AprX_sm2F	Pse_AprXR2	720 bp

Tabella 3.8: combinazioni di *primer* testate per trovare la coppia più efficiente nell'amplificazione delle sequenze *AprX*.

Come stampo è stato utilizzato il DNA genomico dei ceppi CECT3, CECT4 e DSM8 che è stato ottenuto mediante bollitura, come descritto nel paragrafo 3.3.

La miscela di reazione per effettuare la PCR, del volume finale di 20 μ l, era così composta:

- 4 μ l di *Buffer* di reazione 5X;
- 2 μ l di MgCl₂ 25 mM;
- 0,2 μ l di dNTPs 25 μ M;
- 0,5 μ l di *primer forward*;
- 0,5 μ l di *primer reverse*;
- 0,16 μ l di *Taq polimerasi* 5 U/ μ l;
- 2,5 μ l di DNA [circa 10 ng];
- 10,14 μ l di H₂O BDH.

Nella reazione è stato utilizzato come enzima la *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* (Promega Corporation, Madison, USA), posta all'interno del *buffer* di reazione (*GoTaq® Flexi Buffer*) proposto dal kit commerciale.

I campioni sono stati amplificati mediante il termociclatore Euroclone CELBIO e il protocollo termico prevedeva le seguenti fasi:

Attivazione della <i>Taq polimerasi</i>	94°C per 2 minuti	
Denaturazione	94°C per 20 secondi	} 35 cicli
Annealing	60°C per 30 secondi	
Allungamento	72°C per 1 minuto	
Estensione finale	72°C per 7 minuti	

La successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% ha indicato la migliore combinazione tra le coppie di *primer* utilizzate.

3.15 Amplificazione delle sequenze *aprX* dei ceppi di referenza

L'amplificazione delle sequenze *aprX* è avvenuta per tutti i ceppi di referenza ed il DNA è stato ottenuto mediante una estrazione per bollitura, come riportato nel paragrafo 3.3.

La miscela di reazione, in un volume finale di 20 μl , era così composta:

- 4 μl di *Buffer* di reazione 5X;
- 2 μl di MgCl_2 25 mM;
- 0,2 μl di dNTPs 25 μM ;
- 0,5 μl di *primer forward* Pse_AprXF1;
- 0,5 μl di *primer reverse* Pse_AprXR1;
- 0,16 μl di *Taq polimerasi* 5 U/ μl ;
- 2,5 μl di DNA [circa 10 ng];
- 10,14 μl di H₂O BDH.

E' stato utilizzato lo stesso protocollo termico precedentemente descritto ed è stata eseguita la corsa elettroforetica al fine di apprezzare la corretta amplificazione.

3.16 Sequenziamento delle sequenze *aprX* mediante metodo Sanger

Il sequenziamento delle sequenze *aprX* è stato effettuato da MacroGen EU (Meibergdreef, Amsterdam, The Netherlands) utilizzando il metodo Sanger, descritto in precedenza nel paragrafo 3.4.

Come *primer forward* è stato utilizzato Pse_AprXF1 (Tab. 3.7), fornito alla MacroGen insieme al prodotto PCR.

Ottenuti i cromatogrammi, questi sono stati in seguito sottoposti ad analisi bioinformatiche.

3.17 Analisi bioinformatiche

3.17.1 Finch TV

I cromatogrammi ottenuti dal sequenziamento sono stati analizzati mediante il *software* bioinformatico FinchTV, come descritto nel paragrafo 3.7.1, e le sequenze sono state poste in formato FASTA per essere sottoposte al successivo allineamento.

3.17.2 Allineamento delle sequenze e ottenimento dell'albero filogenetico

Come in precedenza, l'allineamento è stato eseguito con il *software online* ClustalW. In seguito è stato creato un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* con il programma PhyML, usando le impostazioni di *default* mediante l'applicazione "One-Click".

3.18 Estrazione del DNA dai ceppi di referenza

Il DNA dei ceppi di referenza (Tab. 3.1) è stato estratto mediante il kit commerciale *Invisorb Spin Tissue Mini Kit* (Invitrogen-Life Technologies Corporation, NY, USA).

Inizialmente è stato effettuato un preinoculo dei ceppi in 3 ml di brodo TSB per mezzo di un'ansa da 10 µl e i campioni sono stati posti a 22°C per 48 ore. In seguito, dopo aver agitato vigorosamente, sono stati prelevati 1,5 ml di sospensione batterica che sono stati posti in una microprovetta da 2 ml.

L'estrazione del DNA si suddivideva in 2 fasi: una prima fase di lisi mediata dalla *proteinasi K* e una seconda fase di purificazione.

La prima fase prevedeva una centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti; il surnatante è stato scartato e il *pellet* ottenuto è stato risospeso in 400 µl di *Lysis Buffer G*. In seguito sono stati addizionati 20 µl di *proteinasi K* e la miscela è stata mescolata bene mediante *vortex*. E' avvenuta dunque un'incubazione a 70°C per 10 minuti, seguita da un'incubazione a 95°C per 5 minuti. Infine sono stati addizionati 40 µl di *RNAsi* e la miscela è rimasta a riposo a temperatura ambiente per 5 minuti.

Nella seconda fase di purificazione, la miscela ha subito una centrifugazione a 14.000 rpm per 2 minuti per eliminare il materiale non digerito che era rimasto sul fondo, mentre il surnatante è stato prelevato e posto in un nuovo tubino. Sono stati poi aggiunti 200 µl di *Binding Buffer T* e la miscela è stata agitata per 10 secondi prima di essere trasferita su di una colonnina in silice (fornita dal kit). Dopo un'incubazione di 1 minuto, è avvenuta una centrifugazione a 12.000 rpm per 2 minuti. Il filtrato è stato eliminato, la colonnina è stata reinserita nel tubino, sono stati addizionati 550 µl di *Wash Buffer* ed è avvenuta una centrifugazione a 12.000 rpm per 1 minuto. Il filtrato è stato eliminato e il lavaggio con *Wash Buffer* è stato ripetuto.

Inoltre la colonnina ha subito un'ulteriore centrifugazione a vuoto per eliminare

completamente le tracce di etanolo (contenuto nel *Wash Buffer*) eventualmente presenti. Infine la colonnina è stata inserita in un nuovo tubino, sono stati aggiunti 50 µl di *Elution Buffer D*. Dopo aver lasciato a temperatura ambiente per 3 minuti, è stata eseguita una centrifugazione a 10.000 rpm per 2 minuti, la colonnina è stata eliminata e l'eluato è stato conservato a -20°C.

3.19 Quantificazione del DNA mediante NanoDrop

Il DNA estratto è stato quantificato mediante un particolare spettrofotometro: il NanoDrop® ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Questo strumento legge nel campo dell'UV-visibile ed è in grado di processare volumi di campione molto bassi, fino a 1 µl. Una goccia di campione viene posta tra due superfici al di sopra di una piastra di lettura e viene creata una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche che rilevano l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm. Oltre alla quantità di acido nucleico presente, lo strumento permette di stimare la qualità attraverso il calcolo del rapporto tra le letture a $\lambda=260/\lambda=280$ e a $\lambda=260/\lambda=230$. Il primo rapporto descrive la contaminazione ad opera di proteine, mentre il secondo la contaminazione dovuta a zuccheri liberi e solventi. Con un buon livello di purezza il valore dei due rapporti è compreso tra 1,8 e 2,1.

3.20 Messa a punto della metodica di *Real Time PCR*

3.20.1 La metodica *Real Time PCR*

La *Real Time PCR* è una tecnica che permette di valutare in tempo reale l'amplificazione delle molecole di DNA per tutta la durata della reazione in modo sensibile e specifico e senza manipolazioni *post-PCR*. In questo modo si procede a una quantificazione del DNA che può essere assoluta o relativa (nel caso in cui vengono fatti studi di espressione genica).

Una buona quantificazione è resa possibile dall'utilizzo di sonde fluorescenti come ad esempio le sonde *Taqman* (sonde a idrolisi che si legano in modo specifico) che sono marcate all'estremità 5' con una molecola *reporter* che può emettere fluorescenza e al 3' con una molecola *quencher* che reprime l'emissione di fluorescenza della molecola *reporter*. Durante la fase di *annealing*, oltre ai *primer* si appaia anche la sonda *Taqman*

e nella fase di allungamento la *DNA polimerasi*, che ha attività esonucleasica in direzione 5' → 3', inizia a rompere e staccare la sonda, rilasciando la molecola *reporter* che, allontanandosi dalla molecola *quencher*, emette fluorescenza che viene registrata dallo strumento.

Tuttavia per limitare i costi, la quantificazione può essere effettuata utilizzando un colorante come il *Sybr Green*. Questo è un intercalante del DNA, meno specifico rispetto alle sonde, che si lega alla doppia elica ed emette fluorescenza se opportunamente eccitato. Legandosi a qualunque molecola di DNA, il *Sybr Green* non permette di discriminare tra il prodotto desiderato e prodotti aspecifici.

Data la minore specificità dell'approccio, è necessaria l'analisi di una curva di dissociazione, in modo da visualizzare la differente velocità di denaturazione della doppia elica con l'aumentare della temperatura da 60°C a 95°C. In base alla sequenza nucleotidica e alla velocità con cui si aprirà l'elica, si ottiene una luminescenza in seguito alla liberazione del *Sybr Green* che si stacca dalla doppia elica: i dimeri di *primer* richiedono minore energia per staccarsi e dunque liberano prima il *Sybr Green*, mentre i prodotti PCR sono più lunghi e quindi liberano la molecola fluorescente in un secondo momento; lo strumento rileva l'intensità luminosa e traduce il segnale come picco.

Per effettuare la quantificazione deve essere stabilita la soglia *threshold*, ovvero la soglia di fluorescenza: il punto specifico della curva dove determinare la quantificazione. Questo punto viene scelto dal *software* come punto di massima pendenza (efficienza massima di reazione) e da questo punto viene estrapolato il "*Ciclo threshold*", detto anche *Crossing Point* (CP): tanto più è basso, tanto più concentrato è l'acido nucleico.

Nell'esperimento viene solitamente utilizzato anche un campione calibratore, usato come *standard*, per fare la quantificazione relativa.

Per fare una corretta quantificazione, l'efficienza della reazione deve essere superiore al 90%. Se è al di sotto del 90%, la reazione non è più lineare, quindi non è più prevedibile matematicamente e la curva non risulta utilizzabile per fare la quantificazione.

L'efficienza della reazione viene calcolata in base alla pendenza della retta che dipende dal coefficiente angolare. Vengono dunque preparate delle diluizioni seriali *standard* a concentrazione note a cui corrisponderanno diverse curve che il *software* utilizza per fare la retta e calcolarne la pendenza. Con pendenze tra -3,6 e 3,1 l'efficienza è tra il 90 e il 100%.

Nel caso specifico di questo studio, la metodica è stata progettata per valutare l'espressione del gene *aprX* nei diversi ceppi di *Pseudomonas* all'interno di un sistema complesso quale il latte.

3.20.2 Disegno dei *primer*

Per il disegno dei *primer* è stato usato il *software online* PriFi che permette, caricando l'allineamento, di trovare le migliori coppie di *primer* per l'approccio *Real Time*.

Il disegno dei *primer* è avvenuto ponendo determinate caratteristiche: lunghezza dell'amplicone compresa tra 50 e 210 bp, lunghezza del *primer* compresa tra 19 e 23 nucleotidi, contenuto di G-C tra il 35 e il 65 % e con temperatura di *melting* compresa tra 55 e 65°C.

Per la messa a punto del metodo, sono stati disegnati i *primer* per quattro dei sei gruppi evidenziati dall'albero filogenetico. Essi sono riportati nella tabella 3.9.

Gruppo	<i>Primer</i>	Sequenza	Dimensioni amplicone	T _m (°C)
1	<i>aprX_1_rt_f</i>	CCAACCAGAACTTCAGCAAAG (21)	198 bp	57,9
	<i>aprX_1_rt_r</i>	ATACCGAGAACACCAGCTTG (20)		57,3
2	<i>aprX_2_rt_f</i>	CAACCAGAACTTCAGCAAGG (20)	200 bp	56,0
	<i>aprX_2_rt_r</i>	CCCAGACCGAAAACACCAG (19)		56,4
3	<i>aprX_3_rt_f</i>	CATGAGTTACTGGAGCGAGAG (21)	167 bp	59,8
	<i>aprX_3_rt_r</i>	TGTTGGAGTTGAACCCGTAG (20)		57,3
5	<i>aprX_5_rt_f</i>	CGATCCAGAACTCTACGGTG (21)	135 bp	57,4
	<i>aprX_5_rt_r</i>	CATCCCATACCGAGAACACC (20)		57,1

Tabella 3.9: *primer* disegnati per il saggio di *Real Time* PCR con relative dimensioni dell'amplicone e temperature di *melting*.

3.20.3 Determinazione dell'efficienza della reazione

L'efficienza di amplificazione dei *primer* è stata determinata mediante la costruzione di rette *standard* utilizzando dieci diluizioni seriali per ogni campione, secondo un fattore di diluizione 1:2 e partendo dalla concentrazione di 2 ng/μl.

Le rette sono state costruite riportando in ordinata i valori di CP e in ascissa il logaritmo delle diluizioni del campione.

I campioni sono stati testati in duplicato ed è stato inserito nell'analisi anche un controllo negativo in cui vi era acqua al posto del DNA genomico.

La miscela di reazione per effettuare la *Real Time* PCR, del volume finale di 10 µl, era così composta:

- 5 µl di *Platinum Quantitative PCR Super Mix 2X*;
- 0,25 µl di *primer forward*;
- 0,25 µl di *primer reverse*;
- 2 µl di acqua BDH;
- 2,5 µl di DNA.

La *Platinum Quantitative PCR Super Mix* è una miscela di reazione contenente 60 U/mL *Platinum Taq DNA polymerase*, 40 mM Tris-HCl a pH 8.4, 100 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 800 µM dUTP, 40 U/mL UDG e stabilizzatori. Particolarmente importante è la presenza dell'enzima *Uracil DNA Glucosilasi* (UDG) che previene il fenomeno del “*carry over*”, ovvero la contaminazione dovuta a precedenti reazioni PCR, riconoscendo la presenza dell'Uracile.

Il protocollo termico prevedeva le seguenti fasi:

Attivazione dell'enzima UDG	50°C per 2 minuti	} 45 cicli
Denaturazione	94°C per 10 secondi	
Denaturazione	94°C per 10 secondi	
Annealing	60°C per 30 secondi	
Cooling	40°C per 30 secondi	

La reazione è avvenuta impiegando lo strumento *LightCycler® 480 System* (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland). Dopo l'avvenuta reazione, è stata calcolata l'efficienza di reazione mediante il *software* dello strumento.

3.21 Saggio TNBS

Al fine di valutare il grado di degradazione delle proteine del latte ad opera di *Pseudomonas*, è stato utilizzato il saggio TNBS, una metodica messa a punto nel 1979 da Adler-Nissen.

Grazie a questo saggio è possibile stimare il grado di idrolisi proteica andando ad analizzare il numero di amminoacidi liberi. Si tratta di un metodo spettrofotometrico dove viene rilevata la colorazione che si forma a seguito della reazione tra il reagente TNBS (*trinitrobenzenesulfuric acid*) con gli amminoacidi liberi in condizioni alcaline.

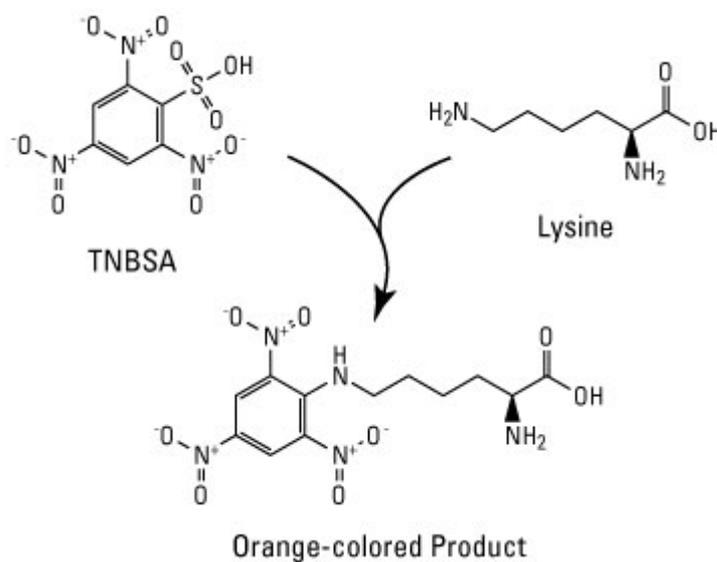


Figura 3.1: reazione tra il TNBS e un amminoacido, che porta alla formazione di un prodotto colorato.

La metodica TNBS nel corso degli anni ha subito numerose modifiche: nel 1966 Habeeb introdusse l'uso di Sodio Dodecil Solfato (SDS) per denaturare le proteine presenti nel campione, mentre Kotaki nel 1964 utilizzava mercaptoetanolo per prevenire l'aggregazione tra le proteine; infine nel 1974 Burger introdusse l'utilizzo di *buffer* fosfati per l'alcalinizzazione del mezzo (Adler-Nissen, 1979).

Tuttavia non vi è un protocollo TNBS preciso per determinare gli amminoacidi liberi presenti nel latte e i protocolli presenti in bibliografia sono in contrapposizione l'uno con l'altro.

Per questo motivo, partendo dal protocollo stilato da Adler-Nissen, è stato messo a punto un saggio TNBS in grado di misurare il grado di idrolisi proteica in una complessa matrice alimentare come il latte, seguendo la procedura presente nello studio di Marchand e colleghi (Marchand et al., 2008).

3.21.1 Preparazione dei campioni

Inizialmente è stato scelto di saggiare, in base alla ricostruzione filogenetica ottenuta precedentemente, sette ceppi di referenza, riportati nella tabella 3.10.

CEPPO	Codice di riferimento del laboratorio	Specie batterica
DSM17489T	DSM6	<i>Pseudomonas orientalis</i>
DSM6252T	DSM9	<i>Pseudomonas lundensis</i>
DSM14020T	DSM10	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>
DSM17149T	DSM12	<i>Pseudomonas libanensis</i>
CECT229T	CECT2	<i>Pseudomonas marginalis</i>
CECT378T	CECT3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
CECT446T	CECT4	<i>Pseudomonas fragi</i>

Tabella 3.10: Type Strains di *Pseudomonas* utilizzati per il saggio TNBS.

I ceppi presi in esame sono stati preinoculati nel brodo di coltura TSB e posti a 22°C per 3 giorni. Dopo un preinoculo singolo, è stato deciso di operare in triplicato in modo da avere più repliche biologiche e ottenere un risultato statisticamente significativo.

In seguito, 100 µl di preinoculo sono stati posti in 10 ml di latte UHT e le provette sono state poste a 22°C per 24 ore. Questa è stata una fase di adattamento al nuovo substrato e il giorno seguente è stato ripetuto il passaggio ponendo 100 µl di latte inoculato con i batteri in 10 ml di latte UHT. Le *falcon* sono state nuovamente poste a 22°C per 24 ore. Dopo l'incubazione sono state effettuate delle conte su piastra per stimare la concentrazione batterica ottenuta.

Sono state dunque effettuate cinque diluizioni seriali per ogni campione, che in seguito sono stati posti a 5°C per 5 giorni. In questa fase *Pseudomonas* era in grado di replicarsi e di secernere le proteasi termoresistenti.

E' stato testato anche un "bianco" come controllo, rappresentato da latte non inoculato che tuttavia è stato sottoposto a tutti gli *step* ai quali sono stati sottoposti anche i campioni.

Dopo la fase di refrigerazione, i campioni hanno subito un trattamento termico a 95°C per 8 minuti e 45 secondi al fine di sterilizzare il latte ed eliminare *Pseudomonas*.

Infine, i campioni sono stati posti a 37°C per due settimane. In questa fase, qualora nel mezzo ci fosse stata la presenza di proteasi termoresistenti AprX secrete da *Pseudomonas*, l'idrolisi proteica doveva risultare molto più spiccata nei campioni

rispetto al controllo.

Alla fine delle due settimane si è proceduto con la reazione del TNBS e la lettura allo spettrofotometro.

3.21.2 Costruzione delle rette di taratura

La quantificazione degli amminoacidi liberi necessitava di una retta di taratura che è stata costruita utilizzando come *standard* l'amminoacido glicina.

Sono stati dunque preparati dei campioni *standard* di glicina in SDS 1% alle seguenti concentrazioni: 2,5 mM, 2,25 mM, 2 mM, 1,75 mM, 1,5 mM, 1,25 mM, 1 mM, 0,75 mM, 0,5 mM, 0,25 mM e 0 mM (campione usato come bianco).

In seguito, 250 µl di ogni soluzione sono stati posti in 2 ml di sodio fosfato dibasico (Na_2HPO_4) a pH 8.2.

Dopo aver aggiunto 2 ml di TNBS 0,1%, gli *standard* sono stati incubati al buio a 50°C per 60 minuti per far avvenire la reazione.

La reazione è stata fermata aggiungendo 4 ml di HCl 0,1 N e, dopo aver lasciato a riposo per almeno 30 minuti, è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 420 nm.

Sono state costruite due rette di taratura: una per le letture effettuate prima del trattamento termico (ovvero dopo 5 giorni di incubazione a 5°C) e una per le letture effettuate dopo il trattamento termico e la successiva incubazione di due settimane a 37°C.

Dalla successiva lettura allo spettrofotometro a lunghezza d'onda di 420nm sono stati ottenuti i seguenti valori di assorbanza, riportati in tabella 3.11.

Lettura dopo 5 giorni a 5°C	
Concentrazione (mM)	Assorbanza
0,0000	0
0,0625	0,0676
0,1250	0,1170
0,1875	0,1629
0,2500	0,2092
0,3125	0,2658
0,3750	0,3001
0,4375	0,3632
0,5000	0,3995
0,5625	0,4404
0,6250	0,4996

Tabella 3.11: letture dell'assorbanza dei campioni *standard* di glicina per la costruzione della retta di taratura prima del trattamento termico.

I dati di assorbanza riportati nella tabella 3.11 tengono in considerazione l'utilizzo di 250 µl delle soluzioni *standard*. Per questo motivo le concentrazioni realmente processate sono state divise per un fattore 4. Lo stesso tipo di visualizzazione è stato utilizzato anche per la tabella che riporta i valori di assorbanza per la costruzione della seconda retta di taratura. Con i risultati di assorbanza ottenuti è stata costruita la retta di taratura riportata nella figura 3.2.

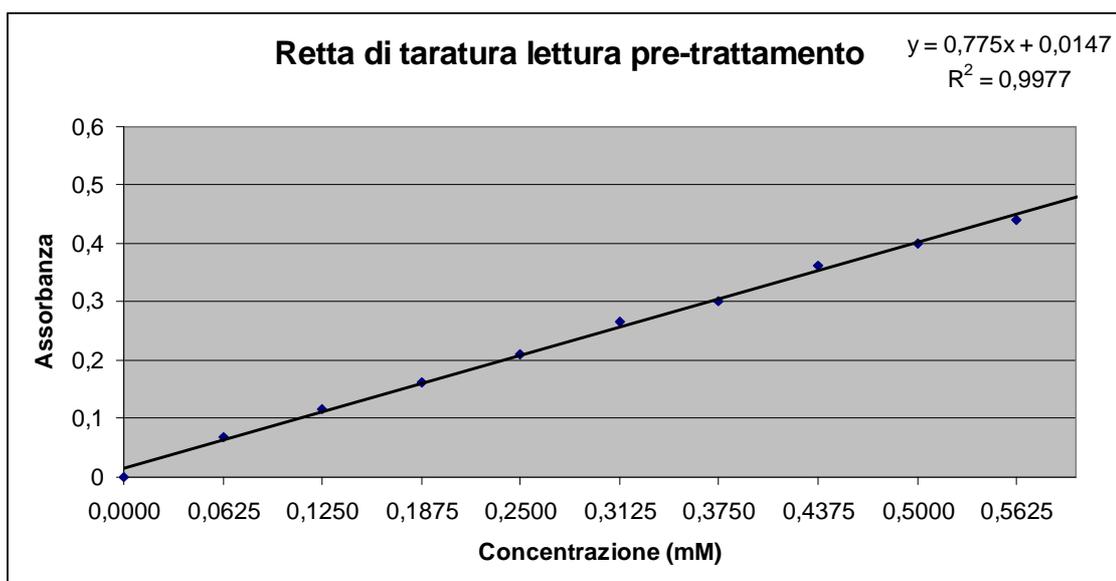


Figura 3.2: retta di taratura, costruita con gli *standard* di glicina, utilizzata per le letture pre-trattamento termico.

Per quanto riguarda la lettura finale, i valori di assorbanza ottenuti sono stati riportati in tabella 3.12.

Lettura finale	
Concentrazione (mM)	Assorbanza
0,0000	0
0,0625	0,0712
0,1250	0,1190
0,1875	0,1594
0,2500	0,2250
0,3125	0,2682
0,3750	0,3000
0,4375	0,3648
0,5000	0,3990
0,5625	0,4421
0,6250	0,5033

Tabella 3.12: letture dell'assorbanza dei campioni *standard* di glicina per la costruzione della retta di taratura utilizzata per la lettura finale dei campioni in latte.

Grazie a questi dati è stata costruita una retta di taratura anche per la lettura dei campioni rimasti in incubazione a 37°C per due settimane. La retta ottenuta è stata riportata nella figura 3.3.

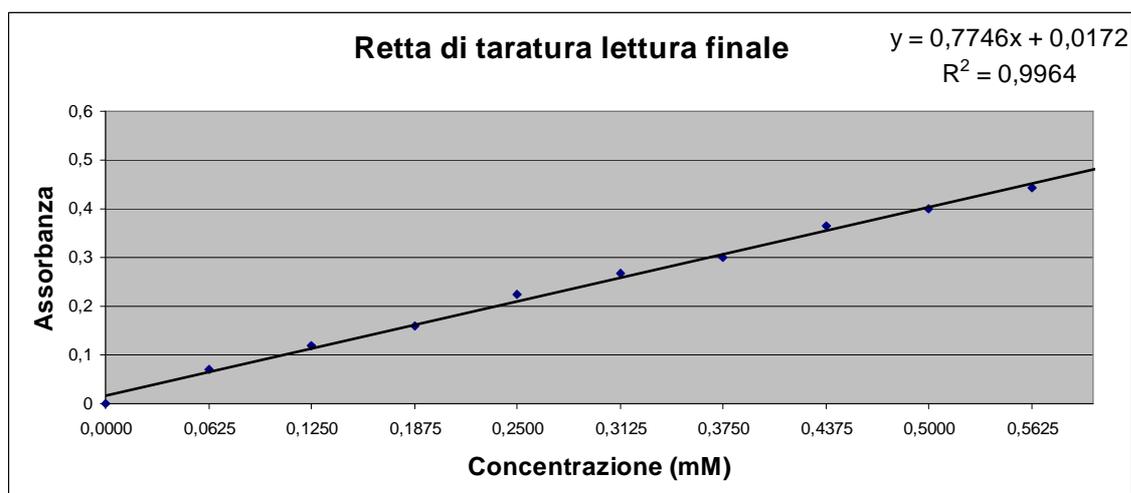


Figura 3.3: retta di taratura ottenuta con gli *standard* di glicina utilizzata per la lettura finale dei campioni dopo l'incubazione per due settimane a 37°C.

3.21.3 Valutazione degli amminoacidi liberi

Dopo aver costruito la retta di taratura, si è proceduto con la determinazione del grado di idrolisi proteica nei campioni di interesse.

Inizialmente sono stati prelevati 250 µl di campione che sono stati posti in 2 ml di SDS 1%. A sua volta, 250 µl di questa miscela sono stati posti in 2 ml di sodio fosfato dibasico a pH 8.2.

Dopo aver aggiunto 2 ml di TNBS 0,1%, i campioni sono stati posti al buio a 50°C grazie ad un bagnetto termoriscaldato.

La reazione è stata bloccata con 4 ml di HCl 0,1 N e, dopo aver lasciato a temperatura ambiente per 30 minuti, è stata eseguita la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 420 nm.

4. RISULTATI

4.1 Isolamento di ceppi di *Pseudomonas* da pancetta

La pancetta che è stata processata in questo studio presentava una colorazione blu, soprattutto in corrispondenza delle zone ricche di grasso.



Figura 4.1: campione di pancetta processato nel presente studio, dove è visibile l'anomala colorazione blu.

Dopo l'incubazione a 22°C, sul terreno OGA, specifico per muffe e lieviti, non vi è stata crescita di microrganismi, dunque la colorazione blu non è stata attribuita alla presenza di muffe.

Di particolare interesse è stata la crescita di una colonia produttrice di un pigmento blu scuro su una piastra di terreno PDA: questa è stata isolata, stoccata in TSB e glicerolo a -20°C e al ceppo è stato assegnato il nome *BlackBacon* (BB).

Le altre colonie presentavano colorazioni bianche o trasparenti, con superfici rugose o lisce. Per queste è stato scelto di effettuare il riconoscimento di specie mediante l'amplificazione della regione 16S dell'rRNA che è stata effettuata mediante i primer 16S_Bact331F e 16S_Bact798R.

La successiva analisi delle sequenze nucleotidiche ottenute con il sequenziamento ha permesso di identificare la presenza di *Serratia* spp., *P. lundensis* e *P. azotoformans*, che non sono state tenute in considerazione nel presente studio, essendo già presenti nella ceppoteca del laboratorio.

4.2 Valutazione di caratteri fenotipici dei ceppi di *Pseudomonas fluorescens*

I ceppi presentati in tabella 3.1 e 3.2 della sezione Materiali e Metodi (ceppi di riferimento e ceppi di campo) sono stati sottoposti ad indagine fenotipica per valutare la produzione di pigmentazione e/o fluorescenza e la capacità di deterioramento degli alimenti attraverso la produzione di enzimi come proteasi, fosfolipasi C e lipasi. I terreni utilizzati e le condizioni di crescita sono stati presentati in dettaglio nel paragrafo 3.6 dei Materiali e Metodi. Solamente per una decina tra tutti i ceppi stoccati in ceppoteca, non è stato possibile il recupero e sono quindi stati esclusi dall'analisi fenotipica.

L'osservazione delle piastre è stata eseguita a 3, 7 e 10 giorni e in base alla temperatura di incubazione vi sono state sostanziali differenze: nel caso dell'incubazione a 6°C i caratteri erano visibili almeno dopo il quarto giorno, mentre per le incubazioni a 22°C e 31°C i caratteri erano visibili già dopo 48-72 ore e perdevano di definizione tra il quarto e il settimo giorno.

Tutti i ceppi sono cresciuti sui quattro terreni utilizzati, tranne in alcuni casi in cui non è stata favorita la crescita a 31°C, visibile invece per lo stesso ceppo alle temperature di 6°C e 22°C. I dati sono stati confermati grazie alla replica biologica effettuata per ogni ceppo. Inoltre si è osservato che quasi tutti i ceppi testati erano in grado di produrre enzimi alteranti.

Nelle immagini 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 sono riportati esempi di caratteri fenotipici osservati.

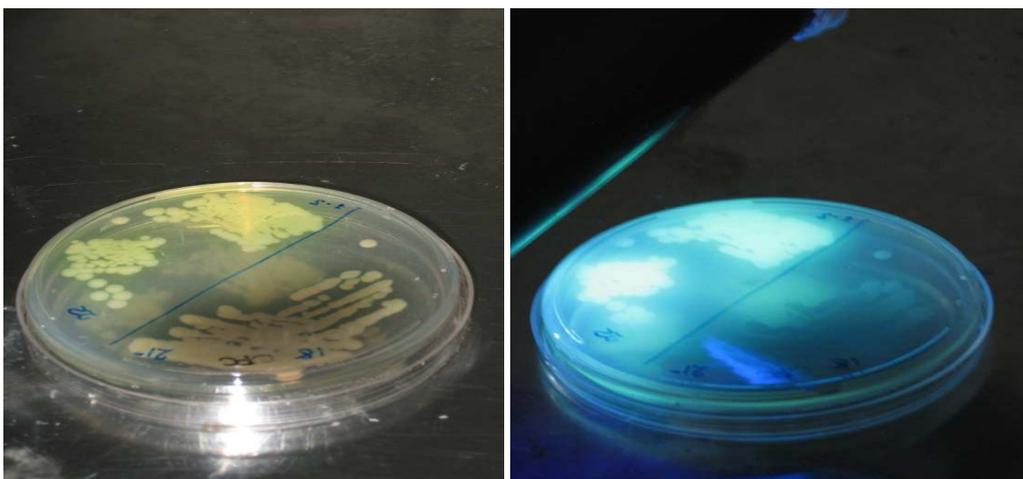


Figure 4.2 e 4.3: crescita di *Pseudomonas* su terreno PAB. Nella figura a destra è possibile notare l'emissione di fluorescenza a seguito dell'esposizione delle colonie alla lampada di Wood.



Figura 4.4: crescita di *Pseudomonas* su terreno PDA, con produzione del pigmento blu scuro.



Figure 4.5 e 4.6: valutazione dell'attività lipasica e lecitinasica (immagine a sinistra) su *Egg Yolk Agar* e dell'attività proteolitica (immagine a destra) su *Nutrient Agar* con 2% di latte.

In tabella 4.1 sono stati riassunti i risultati annotati dall'osservazione dei caratteri fenotipici, con relativo grado di positività o colorazione.

	Colore						Emissione fluorescente			Attività proteolitica			Attività lipolitica			Attività lecitinasica		
	6°		22°		31°		6°	22°	31°	6°	22°	31°	6°	22°	31°	6°	22°	31°
	PAB	PDA	PAB	PDA	PAB	PDA	PAB			NA con LATTE			EYA			EYA		
DSM17152T	-	-	++	-	-	n.c.	-	+++	-	+	++	-	-	++	n.c.	+++	+++	n.c.
DSM15294T	-	-	++	-	-	-	-	++	-	+	++	-	-	++	-	+++	+++	+
DSM17967T	-	-	-	-	-	++	-	++	-	+	+	-	+++	+	-	++	++	-
DSM17150T	-	-	++	-	-	n.c.	+++	++	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
DSM16610T	-	-	-	-	-	++	++	+++	-	+++	+	++	+++	++	-	+	-	-
DSM17489T	-	-	++	-	-	+	-	-	++	+++	++	-	++	+	-	+	+++	-
DSM18928T	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	++	+	-	+++	+	-	++	+++	+
DSM18862T	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+++	-	+
DSM6252T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
DSM14020T	++	-	++	-	++	-	+	++	++	++	+++	-	+++	++	-	-	+	++
DSM11331T	+++	-	+++	-	-	-	+++	+	+	++	++	-	+++	-	-	++	-	-
DSM17149T	+++	-	+++	-	-	-	+	++	+++	+++	++	-	++	+	-	+++	+++	+++
DSM50415T	+	-	++	++ n.d.	++	-	-	-	-	++	++	+	+++	+++	++	-	-	-
CECT124T	-	+++	-	+++	-	++++	-	-	++	-	++	++	-	-	-	-	-	-
CECT229T	-	-	++	-	-	n.c.	-	++	++	-	+++	-	+	+	-	+++	++	-
CECT378T	-	-	+++	-	-	-	+++	+++	++	++	++	-	+	+++	-	+++	+++	++
CECT446T	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	-	++	-	-	+	-	+
CECT4470T	-	-	++	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	+++	++	+++	+++	++
ps_1	++	++	+++	+++	-	-	-	-	-	+	++	-	+	+	++	++	+++	+
ps_2	++	+++	+++	+++	-	-	-	++	-	++	++	-	++	++	-	++	+++	+
ps_3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ps_4	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	+++	-	-	++	+	-	+	++
ps_5	-	+++	+++	+++	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	++	+++	+++
ps_6	++	+++	++++	+++	-	-	-	-	-	++	++	-	++	++	+	++	++	+++

	Colore						Emissione fluorescente			Attività proteolitica			Attività lipolitica			Attività lecitinasica		
	6°		22°		31°		6°	22°	31°	6°	22°	31°	6°	22°	31°	6°	22°	31°
	PAB	PDA	PAB	PDA	PAB	PDA	PAB			NA con LATTE			EYA			EYA		
ps_33	-	-	+++	-	-	-	+++	++	-	++	++	-	++	+	-	+++	+++	++
ps_34	++	-	-	++	-	-	+++	++	-	+++	+++	-	+++	++	-	++	+++	+
ps_35	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	+++	++	-	+++	++	-	++	++	++
ps_36	-	-	++	-	-	-	+++	-	-	+++	++	-	+++	++	-	++	+	++
ps_37	-	-	+++	++	-	+++	+	-	+++	+	++	+++	+++	-	-	-	-	+++
ps_38	-	-	+++	++	-	-	+	-	-	+	++	+++	+++	+++	++	++	++	-
ps_39	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	++	+	+++	+++	-	-	+	-
ps_40	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	+++	++	-	++	+	-	+	++	-
ps_41	dato non disponibile																	
ps_42	dato non disponibile																	
ps_43	dato non disponibile																	
ps_44	dato non disponibile																	
ps_45	dato non disponibile																	
ps_46	dato non disponibile																	
ps_47	dato non disponibile																	
ps_48	-	-	++	-	++	n.c.	+	+++	++	++	+++	+	-	-	-	-	-	-
ps_49	dato non disponibile																	
ps_50	-	-	++	-	++	n.c.	+	-	-	++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-
ps_51	-	-	++	-	++	-	-	+++	++	++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++
ps_52	dato non disponibile																	
ps_53	dato non disponibile																	
ps_54	-	-	++	-	++	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-
ps_55	++	-	+	-	++	-	+	+	+	-	++	+++	+	+	+++	-	-	-
ps_56	++	-	+	-	++	-	++	+	+	+	++	+++	++	+++	++	-	-	-

	Colore						Emissione fluorescente			Attività proteolitica			Attività lipolitica			Attività lecitinasica		
	6°		22°		31°		6°	22°	31°	6°	22°	31°	6°	22°	31°	6°	22°	31°
	PAB	PDA	PAB	PDA	PAB	PDA	PAB			NA con LATTE			EYA			EYA		
ps_57	++	-	++	-	+++	++ n.d.	++	++	++	++	+++	++	++	++	+++	+	+++	+++
ps_58	-	++	+	++	+	-	+	-	+	-	++	++	-	-	-	-	-	-
ps_59	++	-	++	-	++	-	++	+	+	+++	+++	++	++	+++	+	+	+++	+++
ps_60	+	-	++	-	++	++ n.d.	+	+	+	+++	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++
ps_61	+++	-	+++	-	++	++ n.d.	++	+++	++	+	+++	++	-	+	+	+++	+++	+++
ps_62	+++	-	+++	++ n.d.	+++	++ n.d.	+++	++	+++	+	+++	+++	+	+++	++	++	++	+++
ps_63	++	-	+++	-	+++	++ n.d.	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++	+	++	+++	+++
ps_64	++	-	+++	-	+++	-	+	+++	+++	-	+++	+	-	+++	-	++	+++	+++
ps_65	++	-	++	-	+	-	++	++	++	++	+++	+++	++	+++	++	-	-	-
ps_66	+	-	+	-	+	-	++	+++	++	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
ps_67	++	-	+	-	+	-	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
ps_68	+	-	++	++ n.d.	++	++ n.d.	-	+	+	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-
ps_69	-	-	+	-	++	++ n.d.	+	+++	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
ps_70	-	-	+	-	++	-	+	+++	+	+	++	-	-	+++	-	-	+	-
ps_71	-	-	-	-	+	-	+	++	+	+	+	+	-	++	-	-	-	-
ps_72	-	-	+	-	++	-	+	-	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-
ps_73	-	-	++	-	++	-	+	+++	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-
ps_74	-	-	+++	-	++	-	+	-	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
ps_75	-	+++	+++	+++	-	-	++	-	-	-	++	-	-	-	-	++	+++	+++
ps_76	++	+++	+++	+++	-	-	-	++	-	++	++	-	++	++	-	++	+++	+
ps_77	-	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	++	+++	+
ps_78	+++	+	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-	+	n.c.	-	-	-	-	+++	+
ps_79	+	-	+++	+++	+	-	++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-

Tabella 4.1: tabella riassuntiva delle osservazioni fenotipiche effettuate. La sigla n.c. corrisponde alla mancata crescita del ceppo, mentre n.d. indica che il pigmento non era diffuso. In alcuni casi il fenotipo rilevato non è disponibile. Lo sfondo della cella corrisponde al colore osservato, se vi era una colorazione interna alla colonia, questa è stata indicata mediante la colorazione del testo all'interno della cella.

Tutti i ceppi sono cresciuti su terreno PAB. Alcuni ceppi non producono alcun pigmento a 6°C e 31°C, mentre la maggior parte (75,86%) produce un pigmento a 22°C, in particolar modo quello giallo.

Di particolare interesse sono stati i ceppi Ps_1, Ps_2, Ps_5, Ps_6, Ps_12, Ps_22, Ps_25, Ps_75, Ps_76, Ps_77, Ps_78 e Ps_79 che hanno prodotto un pigmento blu che col passare dei giorni di incubazione in alcuni casi è virato al blu scuro o grigio/nero.

Inoltre, i ceppi *P. fluorescens* biovar IV (*P. lemonnieri*/DSM50415T), ps_62 e ps_68 producono su PDA un pigmento blu non diffusibile.

P. libanensis (DSM17149T), che era stata indicata come ceppo responsabile della colorazione blu delle mozzarella nel report del RASFF, non ha prodotto alcun pigmento su PDA.

Per quanto riguarda l'emissione di fluorescenza, questa è stata rilevata in più della metà dei ceppi. Infine, l'attività proteolitica è stata rilevata nel 94,25% dei ceppi, l'attività lipolitica nel 75% e l'attività lecitinasica nel 50% dei casi.

4.3 Clustering analysis con Software R

Grazie all'analisi statistica effettuata dal Dott. Luca Fasolato mediante il *software* R, è stato possibile suddividere i ceppi in *cluster* sulla base delle loro caratteristiche fenotipiche, quali la produzione di enzimi a tre diverse temperature e il grado di intensità enzimatica.

L'analisi ha permesso l'assegnazione dei ceppi a 4 diversi gruppi: 1) attività enzimatica bassa; 2) attività enzimatica medio-bassa; 3) attività enzimatica medio-alta; 4) attività enzimatica alta (dati non mostrati).

4.4 Challenge test su mozzarella

Il ceppo BB isolato da pancetta (vedi paragrafo 4.1 e figura 4.1) è stato sottoposto a *challenge test* per verificare se era in grado di produrre il pigmento blu diffusibile anche in mozzarella. Nell'esperimento sono state utilizzate mozzarelle “*cherry size*” in modo da essere facilmente introdotte anche all'interno di piastre Petri.

Inizialmente la mozzarella era stata mantenuta a 4°C per 7 giorni all'interno di un sacchetto per *Stomacher* e non era stata rilevata alcuna colorazione. Il sacchetto è stato dunque aperto per rendere l'ambiente aerobio e il liquido di governo appariva torbido.

Dopo 24 ore è stata rilevata la produzione del pigmento blu diffusibile, diventata marcata dopo 48 ore, come illustrato in figura. 4.7.

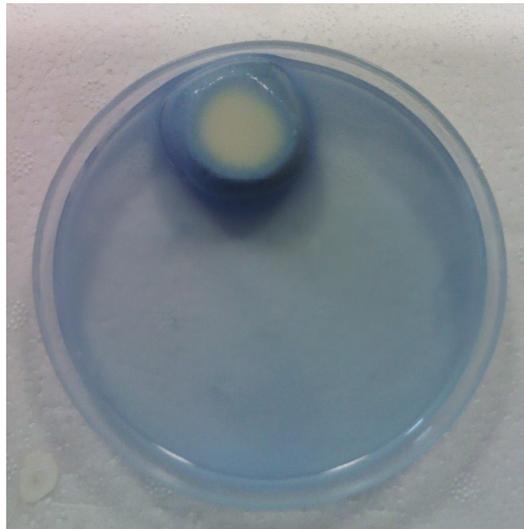


Figura 4.7: *Challenge test* su mozzarella riferito al ceppo BB (ps_79). E' possibile notare la colorazione blu della mozzarella e del liquido di governo, dovuta alla produzione del pigmento.

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

Il sistema di identificazione molecolare MLST, messo a punto per tipizzare i ceppi di *Pseudomonas fluorescens* e già applicato a tutti i ceppi elencati in tabella 3.1 e 3.2, è stato applicato agli ultimi ceppi pervenuti in laboratorio.

L'amplificazione dei loci *glnS*, *gyrB*, *ileS*, *nuoD*, *recA*, *rpoB* e *rpoD* è avvenuta correttamente per i 3 ceppi testati (ps_77, ps_78 e ps_79). I prodotti ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento mediante il metodo Sanger e sono stati ottenuti degli ottimi cromatogrammi con picchi ben definiti.

Tutte le sequenze ottenute mediante il *primer forward* sono state confermate attraverso l'analisi con il *primer reverse*, allineando tra di loro le due sequenze.

4.6 Identificazione degli alleli e dei *Sequence Type*

Per ogni *locus* genico analizzato, sono stati identificati gli alleli mediante il *software* Datamonkey. Oltre ai ceppi testati, sono state inserite in questo studio anche le sequenze di ciascun *locus* ottenute dall'allineamento delle sequenze con 6 genomi completamente sequenziati di *Pseudomonas fluorescens* presenti in GenBank.

La totalità degli alleli evidenziati è stata riportata nella tabella 4.2, integrando i dati ottenuti con quelli già in possesso del gruppo di lavoro della Dott.ssa Barbara Cardazzo.

Ceppo	<i>glnS</i>	<i>gyrB</i>	<i>ileS</i>	<i>nuoD</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoD</i>	ST
<i>Pf</i> SBW25	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Pf</i> 0-1	2	2	2	2	2	2	2	2
<i>Pf</i> 5	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>P. brassicacearum</i>	4	4	4	4	4	4	4	4
A506	5	5	5	5	5	5	5	5
F113	6	6	6	6	6	6	6	6
DSM17152T	7	7	7	7	7	7	7	7
DSM15294T	8	8	8	8	8	8	8	8
DSM17967T	9	9	9	9	9	9	9	9
DSM17150T	10	10	10	10	10	10	10	10
DSM16610T	11	11	11	11	11	11	11	11
DSM17489T	12	12	12	12	12	12	12	12
DSM18928T	13	13	13	13	13	13	13	13
DSM18862T	14	14	14	14	14	14	14	14
DSM6252T	15	15	15	15	15	15	15	15
DSM14020T	16	16	16	16	16	16	16	16
DSM11331T	17	17	17	17	17	17	17	17
DSM17149T	18	18	18	18	18	18	18	18
DSM50415	19	19	19	19	19	19	19	19
CECT124T	20	20	20	20	20	20	20	20
CECT229T	21	21	21	21	21	21	21	21
CECT378T	22	22	22	22	22	22	22	22
CECT446T	23	23	23	23	23	23	23	23
CECT4470T	24	24	24	24	24	24	24	24
ps_1	25	25	25	25	25	25	25	25
ps_2	26	26	26	26	26	26	26	26
ps_3	27	27	27	27	27	27	27	27
ps_4	28	28	28	28	28	28	28	28
ps_5	29	29	29	29	29	29	29	29
ps_6	30	30	30	30	26	30	30	30
ps_7	31	31	31	31	30	31	31	31
ps_8	28	32	28	32	28	28	28	32
ps_9	32	33	32	33	31	32	32	33
ps_10	32	34	33	34	31	32	32	34
ps_11	21	35	34	35	21	33	21	35
ps_12	33	36	35	36	32	34	32	36
ps_13	34	37	36	37	33	35	33	37
ps_14	35	38	37	38	34	36	31	38
ps_15	36	17	38	39	35	37	17	39
ps_16	37	39	39	40	36	38	34	40
ps_17	38	40	40	41	37	39	35	41
ps_18	39	41	41	42	38	40	36	42
ps_19	40	42	42	43	39	41	37	43
ps_20	41	30	43	44	40	30	38	44
ps_21	42	43	44	45	41	42	39	45
ps_22	43	44	45	46	26	43	30	46
ps_23	44	45	46	47	42	44	40	47
ps_24	45	46	47	48	43	45	41	48
ps_25	46	26	48	49	26	30	42	49
ps_26	47	47	49	50	44	46	43	50
ps_27	48	41	50	42	45	47	44	51
ps_28	49	48	51	51	46	48	45	52
ps_29	50	49	52	52	47	49	46	53

Ceppo	<i>glnS</i>	<i>gyrB</i>	<i>ileS</i>	<i>nuoD</i>	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>rpoD</i>	ST
ps_30	51	50	53	53	48	50	47	54
ps_31	50	51	54	54	49	51	48	55
ps_32	52	52	55	55	50	52	49	56
ps_33	53	53	56	56	51	53	50	57
ps_34	50	54	52	52	52	49	46	58
ps_35	54	51	54	54	49	51	48	59
ps_36	55	52	57	57	53	54	51	60
ps_37	56	55	58	58	54	48	52	61
ps_38	56	56	59	58	3	55	3	62
ps_39	57	57	60	59	21	21	21	63
ps_40	58	58	30	60	55	56	53	64
ps_41	59	59	61	61	56	57	54	65
ps_42	60	60	62	62	57	58	55	66
ps_43	61	61	63	63	58	59	56	67
ps_44	62	62	64	64	59	58	55	68
ps_45	63	63	15	65	60	60	15	69
ps_46	60	64	65	66	61	58	57	70
ps_47	64	23	66	67	62	23	58	71
ps_48	62	60	64	66	63	58	59	72
ps_49	65	27	67	68	64	27	27	73
ps_50	66	60	62	66	65	58	59	74
ps_51	67	65	68	69	66	61	3	75
ps_52	68	66	69	70	67	62	43	76
ps_53	62	62	64	70	59	58	55	77
ps_54	60	67	70	71	68	58	60	78
ps_55	69	68	71	72	69	63	61	79
ps_56	70	69	72	73	70	64	62	80
ps_57	39	41	73	42	38	65	36	81
ps_58	71	70	74	74	71	66	63	82
ps_59	72	71	75	75	72	67	64	83
ps_60	73	70		76	73	68	65	
ps_61	74	25	76	77	74	69	25	84
ps_62	75	72		78	75	70	66	
ps_63	76	73		79	76	71	67	
ps_64	77	74	77	80	77	72	68	85
ps_65	78	75	78	81	78	73	45	86
ps_66	79	76	77	82	79	64	69	87
ps_67	80	77	79	83	80	66	70	88
ps_68	81	70	80	74	81	74	71	89
ps_69	82	78	81	84	9	75	72	90
ps_70	83	79	82	85	82	76	73	91
ps_71	84	80	83	86	83	77	74	92
ps_72	85	81	84	87	84	78	75	93
ps_73	86	82	85	88	85	79	76	94
ps_74	62	83	86	62	63	58	59	95
ps_75	29	29	29	29	29	29	29	29
ps_76	26	26	26	26	26	26	26	26
ps_77	87	5	5	89	86	80	77	96
ps_78	88	26	87	44	26	81	78	97
ps_79	89	5	5	90	86	82	5	98

Tabella 4.2: profilo allelico dei ceppi con relativo ST risultante dalla combinazione allelica. I ceppi processati nel presente studio sono stati evidenziati in colore azzurro. Per i ceppi ps_60, ps_62 e ps_63 non è presente il ST in quanto vi sono stati dei problemi nell'amplificazione del locus *ileS*.

La numerosità allelica oscilla tra 78 (*rpoD*) e 90 (*nuoD*), con l'individuazione di 98 diversi ST nel totale dei 103 ceppi presi in esame. I ceppi ps_75 e ps_76 hanno, rispettivamente, lo stesso ST di ps_29 e ps_26 sebbene siano stati isolati da alimenti diversi. Il ceppo Uk1 (ps_77) condivide i *loci gyrB* e *ileS* con A506, Uk4 (ps_78) condivide i *loci gyrB* e *recA* con ps_2, mentre BB (ps_79) condivide i *loci gyrB*, *ileS* e *rpoD* con A506.

Le sequenze geniche per ogni ceppo sono state allineate mediante il *software* ClustalW per verificare la congruenza delle regioni amplificate e l'assenza di *gaps* all'interno dell'allineamento.

4.7 Analisi della variabilità genetica

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

I risultati sono stati sintetizzati nella tabella 4.3.

<i>Locus genico</i>	bp	N° alleli	Contenuto G-C	N° di siti polimorfici	N° siti informativi della parsimonia	Mutazioni sinonime	Mutazioni non-sinonime	Tajima's D test	Θ	π
<i>glnS</i>	501	89	0,616	213	184	159	17	0,740866	0,084018	0,102353
<i>gyrB</i>	492	83	0,559	185	163	201	11	1,457315	0,075354	0,107562
<i>ileS</i>	552	87	0,592	217	182	175	27	0,813253	0,07804	0,096687
<i>nuoD</i>	516	90	0,617	179	144	156	13	0,849773	0,068402	0,085599
<i>recA</i>	435	86	0,604	153	142	193	7	1,605872	0,069985	0,103200
<i>rpoB</i>	477	82	0,575	141	113	122	7	0,097412	0,059383	0,061088
<i>rpoD</i>	480	78	0,563	105	79	129	4	-0,024674	0,044394	0,04407
Concatenamento	3453	98	0,589	1189	1031	1132	85	1,049536	0,06677	0,087297

Tabella 4.3: tabella riassuntiva delle informazioni ottenute mediante il *software* DnaSP: contenuto in G-C, numero di siti polimorfici, numero di siti informativi della parsimonia, numero di mutazioni sinonime e non sinonime, valore D del test di Tajima, valori Θ e π .

Il contenuto di G-C varia tra 0,559 (*gyrB*) e 0,617 (*nuoD*), il numero di siti polimorfici varia da 105 (*rpoD*) a 184 (*glnS*) e le mutazioni sinonime variano da 122 (*rpoB*) a 201 (*gyrB*).

Il valore D del test di Tajima è stato utilizzato per testare “l’ipotesi neutrale”, ovvero che l’evoluzione molecolare fosse dovuta a processi casuali che portano alla sostituzione di un allele neutrale con un altro allele equivalente dal punto di vista funzionale.

In questo caso il valore del *D-test* varia da 1,605872 (*recA*) a -0,024674 (*rpoD*), supportando una selezione di tipo neutrale come atteso, dato l’utilizzo di soli geni *housekeeping* per lo svolgimento dell’analisi.

Infine, la differenza nucleotidica (π) calcolata per i diversi *loci* oscilla tra 0,04407 e 0,107562, mentre il valore Θ varia da 0,044394 a 0,084018.

4.8 Analisi filogenetiche

Dall’allineamento tra le sequenze concatenate di ogni ceppo, è stato ottenuto un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* mediante il *software online* PhyML.

Anche in questo caso, sono state incluse le sequenze corrispondenti a 6 ceppi con genoma sequenziato.

Sono stati identificati due gruppi principali: un primo gruppo *P. fragi* (contenente i *Type Stains* CECT446T e DSM6252T) e un secondo gruppo che è stato a sua volta suddiviso in cinque sottogruppi:

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

L’albero può essere visualizzato in figura 4.8.

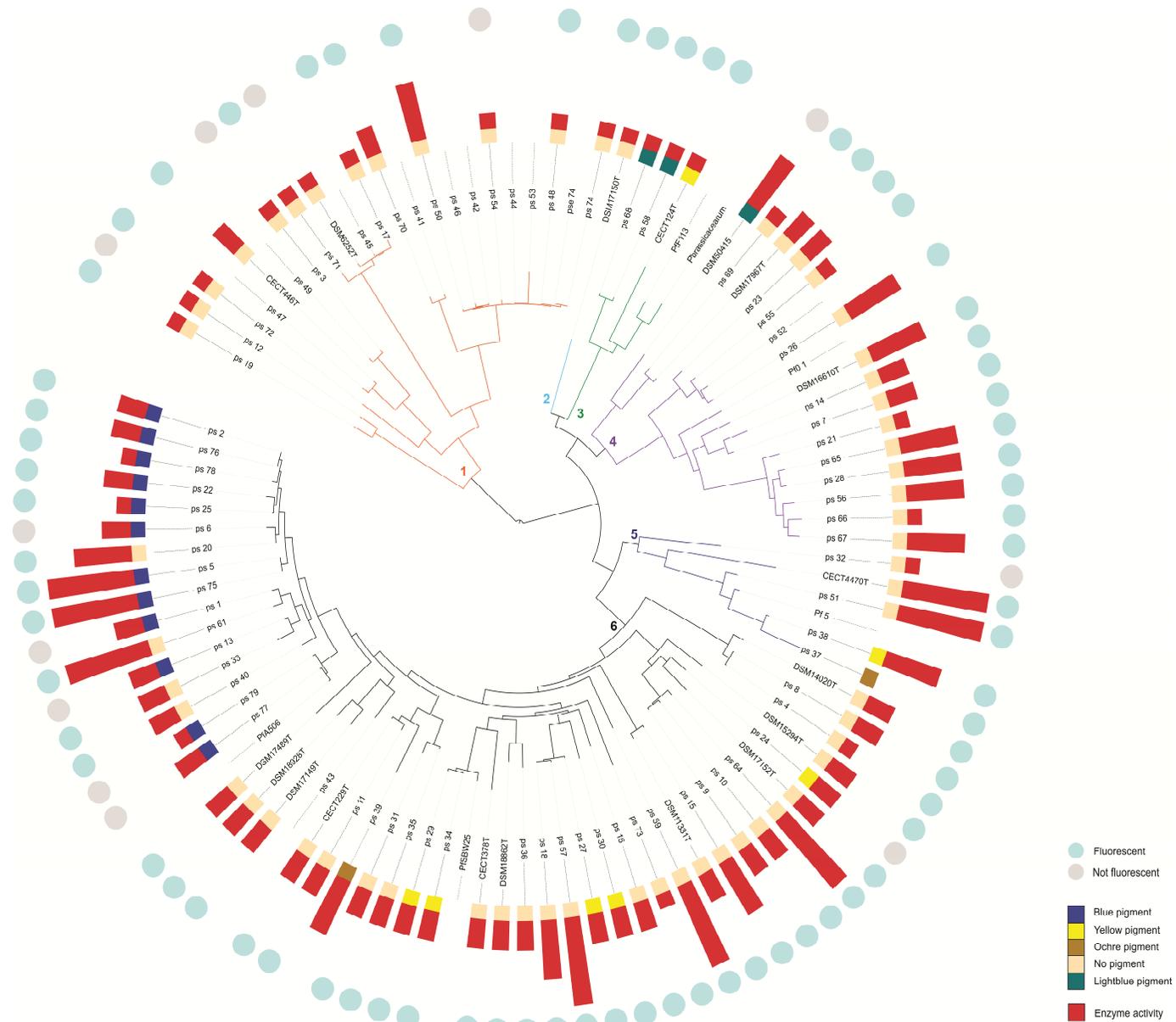


Figura 4.8: albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* ottenuto con le sequenze concatenate di ogni ceppo. Sono stati evidenziati i vari gruppi: 1) gruppo *P. fragi*; 2) gruppo *P. jesseni*; 3) gruppo *P. corrugata*; 4) gruppo *P. koreensis*; 5) gruppo *P. chlororaphis*; 6) gruppo *P. fluorescens*. Nell'albero sono stati riportati anche i dati fenotipici: con un quadratino colorato è stato indicato il tipo di pigmento prodotto su PDA, mentre l'attività enzimatica è stata rappresentata attraverso barre di lunghezza variabile: al grado alterante di livello 4 corrispondono le barre di lunghezza maggiore, che decrescono in base al grado a cui corrispondono. I cerchi esterni azzurri indicano che i ceppi mostravano fluorescenza dopo l'esposizione ai raggi UV, mentre i cerchi grigi indicano la mancata osservazione di questo carattere.

I 12 ceppi che producono il pigmento blu in PDA sono raggruppati in un gruppo filogenetico distinto: il “ramo blu” include ps_1, ps_2, ps_5, ps_6, ps_13, ps_22, ps_25, ps_75, ps_76, ps_77, ps_78, e ps_79; inoltre contiene anche quattro ceppi che non producono tale pigmento: ps_20, ps_33, ps_40 e ps_61. A questo gruppo sono strettamente associati anche il ceppo di *P. fluorescens* A506 e il ceppo di riferimento *P. orientalis* (DSM17489T). Quest’ultimo tuttavia non mostrava produzione di pigmento blu su PDA (Figura 4.1).

4.9 Ricerca di proteasi termoresistenti (AprX) nei genomi completi disponibili online

La sequenza del gene *aprX* è stata identificata come codificante la metalloproteasi termoresistente causa di processi alterativi in alimenti lattiero-caseari (Dufour et al., 2008). La sequenza nucleotidica è disponibile nel *database* GenBank per numerosi ceppi di *Pseudomonas* (Marchand et al., 2009). Tali sequenze sono state utilizzate per ricercare le metalloproteasi presenti nei genomi interamente sequenziati di *Pseudomonas fluorescens*: *P. fluorescens* A506, *P. fluorescens* F113, *P. fluorescens* BW25, *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* Pf0-1 e *P. fluorescens* POAE.

I *locus tag* delle sequenze annotate erano i seguenti: PflA506_2617, PflA506_1813, PflA506_1814, PflA506_2909, PSF113_2949, PSF113_2737, PFLU3146, PFLU1793, PFLU0810, PFL_3210, PFL_2483, Pfl01_2678, Pfl01_3363, H045_08020, H045_07010, H045_21930.

4.10 Allineamento e creazione dell’albero filogenetico

Inizialmente è stato effettuato un allineamento di tutte le sequenze scaricate da GenBank in formato FASTA ed è stato costruito un albero di tipo *Maximum Likelihood* (Fig. 4.9).



Figura 4.9: ricostruzione filogenetica mediante l'albero di tipo *Maximum Likelihood* costruito dall'allineamento delle sequenze ottenute da GenBank.

Gran parte delle sequenze, molte di esse indicate come serralisine, facevano parte di un gruppo distinto e molto esteso, mentre vi era un gruppo ristretto di sequenze molto simili tra di loro, indicate come metalloproteasi.

E' stato dunque effettuato un secondo allineamento tra le sequenze putativamente riconosciute come *aprX* nei genomi completi, che erano quelle più simili alla *AprX* presente in letteratura (Marchand et al., 2009).

Sono state quindi allineate le sequenze, una per ogni genoma, con i seguenti *locus tag*: PflA506_2617, PSF113_2949, PFLU3146, PFL_3210, Pfl01_2678 e H045_08020.

4.11 Disegno e scelta della coppia di *primer*

Le analisi presentate nel precedente paragrafo hanno permesso di evidenziare che alcuni genomi interamente sequenziati di *Pseudomonas fluorescens* contenevano al loro interno più di un gene codificante metalloproteasi (es. Pf0-1, Pf5), mentre alcuni ne contenevano solo uno (SBW25). Per verificare la presenza di questo gene nei nostri ceppi di riferimento, sono stati disegnati, basandoci sugli allineamenti delle sequenze disponibili in GenBank, dei *primer* in grado di amplificare le diverse copie geniche.

I *primer* sono stati disegnati mediante il *software* PriFi e sono state ottenute tre diverse coppie di *primer*, alle quali è stato aggiunto anche un *primer forward* presente in letteratura (Marchand et al., 2009).

Il *primer* Pse_AprXF1 presentava una base degenerata (R: miscela di A + G); tutte le coppie disegnate sono state illustrate nella tabella 3.7, nella sezione Materiali e Metodi.

Con una successiva PCR *end point* è stata definita la migliore coppia di *primer* che

potesse portare alla corretta amplificazione della sequenza *aprX*.

Per questa analisi sono stati testati i ceppi CECT3, CECT4 e DSM8.

Dopo l'elettroforesi su gel di agarosio è stato stabilito che la migliore coppia di *primer* era composta dal *forward* Pse_AprXF1 e dal *reverse* Pse_AprXR1.

Il risultato del gel è riportato nella figura 4.10, facendo riferimento a 3 combinazioni (su 5 complessive effettuate) di *primer* (Tabella 3.8 della sezione Materiali e Metodi).



Figura 4.10: corsa elettroforetica per determinare la migliore coppia di *primer*. I tre ceppi testati sono nell'ordine, da sinistra a destra, CECT3, CECT4 e DSM8. In questa figura è possibile apprezzare l'amplificazione eseguita con le combinazioni di *primer* 1, 2 e 3.

4.12 Amplificazione delle sequenze *aprX* dei ceppi di referenza

Le sequenze *aprX* dei ceppi di referenza sono state amplificate correttamente. Nella corsa elettroforetica si è potuto apprezzare la formazione di una sola banda per ogni campione, tranne nel caso di DSM18928T (*P. synxantha*), ceppo che anche dall'analisi delle sequenze in GenBank sembrava possedere due proteasi termoresistenti (le sequenze non erano state inserite nell'albero presentato in figura 4.8 in quanto si è scelto di inserire solo le sequenze ottenute da genomi definiti "*finished*" escludendo i "*draft genome*"). In figura 4.11 è possibile apprezzare il gel.

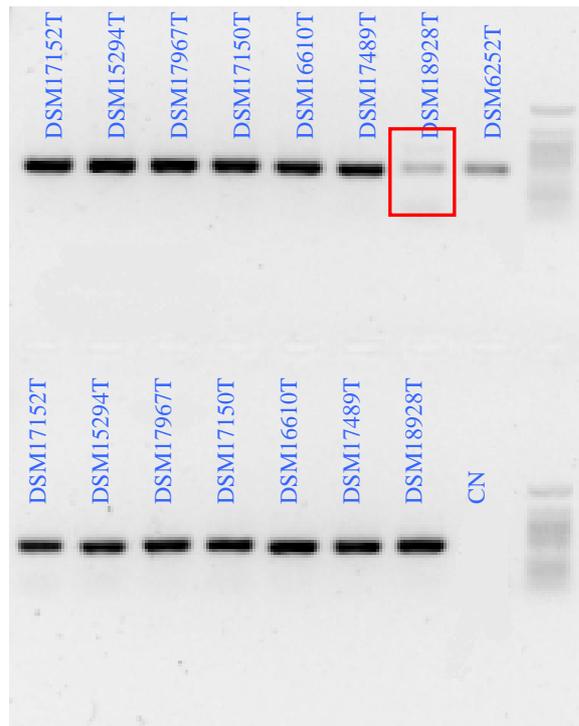


Figura 4.11: gel elettroforetico dell'amplificazione della sequenza *aprX* dei ceppi di referenza. Con CN è indicato il controllo negativo. All'interno del quadrato rosso è stata evidenziata la presenza di una seconda banda riferita al ceppo DSM18928T.

4.13 Sequenziamento dei prodotti PCR

Il sequenziamento dei prodotti PCR ad opera di Macrogen EU ha portato all'acquisizione di sequenze qualitativamente buone, che presentavano picchi ben distinti. Il ceppo CECT5 (*Pseudomonas chlororaphis*), non presente nella foto del gel presentata in figura 4.11, amplificava una singola banda, tuttavia nel cromatogramma la sequenza presentava doppi picchi: è stato escluso un errore durante il sequenziamento e il problema è stato attribuito alla possibilità che questo ceppo presentasse una seconda AprX nel suo corredo genetico. Questo è stato confermato in quanto una seconda metalloproteasi era già stata identificata in studi precedenti (Baglinière et al., 2012).

Nella figura 4.12 è riportato un esempio di cromatogramma, riferito al campione DSM1.

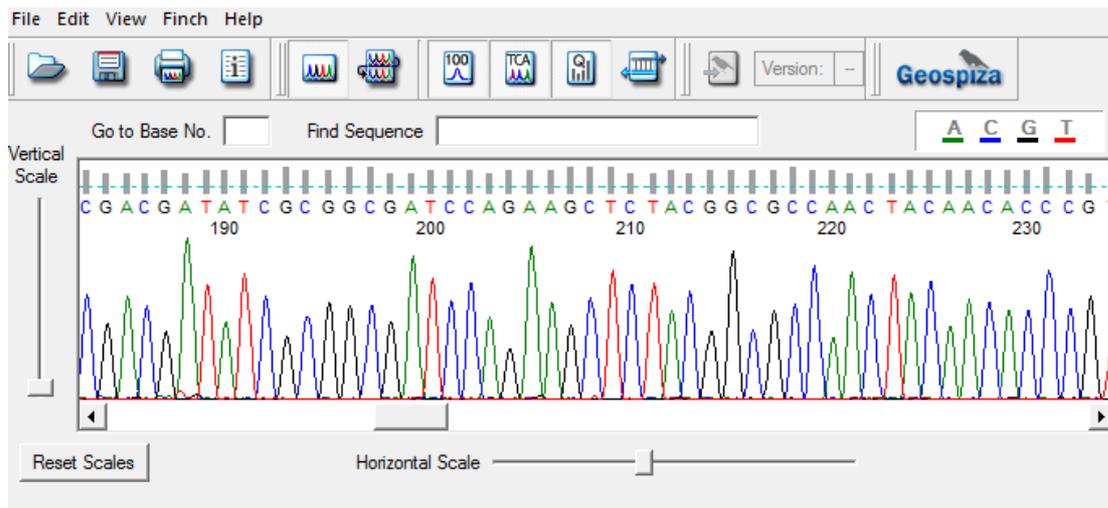


Figura 4.12: cromatogramma ottenuto dal sequenziamento con metodo Sanger della regione *aprX* del ceppo DSM1. Per visualizzare il cromatogramma è stato utilizzato il *software* FinchTV.

4.14 Ottenimento di un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood*

Per valutare l'espressione del gene *aprX* nei ceppi di riferimento, si è deciso di procedere con il disegno di coppie di *primer* da utilizzare in saggi di PCR Real-Time.

Le sequenze ottenute dal sequenziamento del gene *aprX* nei ceppi di riferimento sono state allineate con il *software* ClustalW. In seguito l'allineamento è stato utilizzato per la creazione dell'albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* mediante il programma PhyML.

In figura 4.13 è possibile visualizzare l'albero.

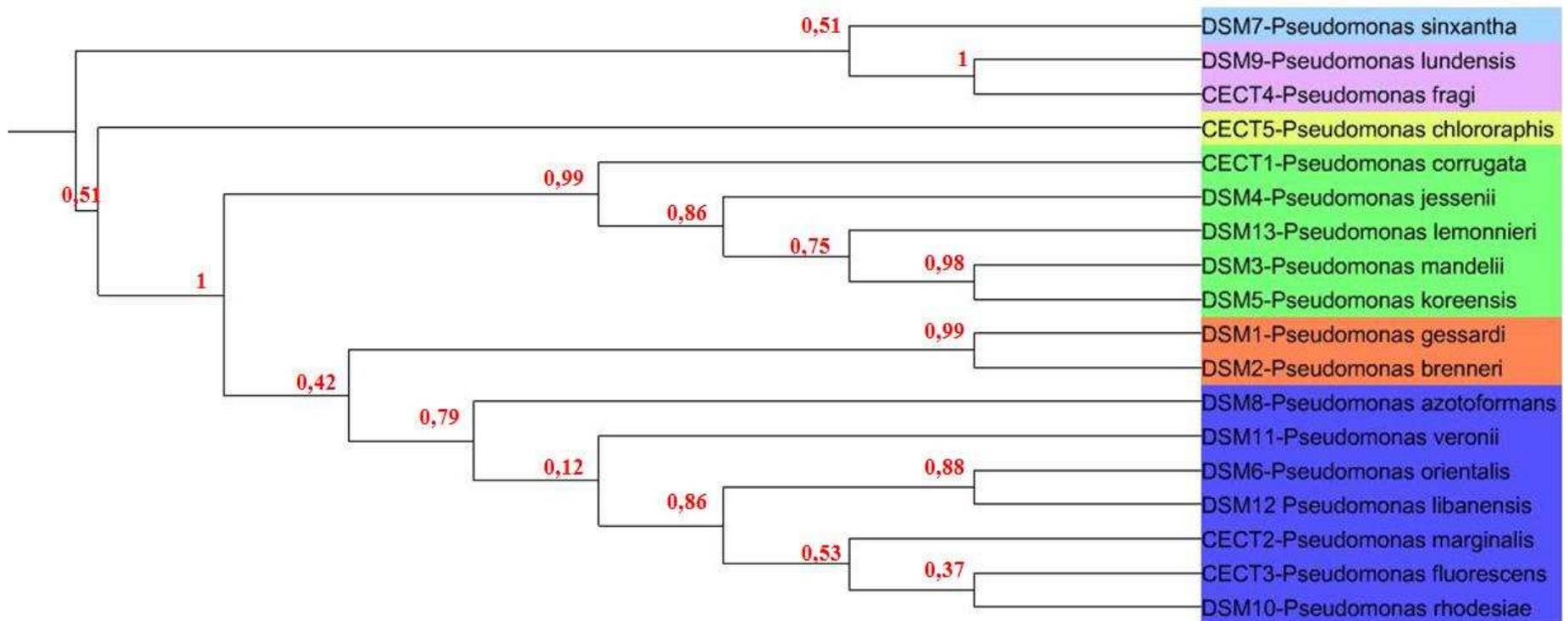


Figura 4.13: albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* ottenuto con le sequenze *aprX* dei ceppi di riferimento. I ceppi sono stati raggruppati in diversi gruppi: il gruppo 1 di colore blu, gruppo 2 di colore arancio, gruppo 3 di colore verde, gruppo 4 di colore giallo, gruppo 5 di colore rosa e gruppo 6 di colore azzurro.

Grazie alla ricostruzione filogenetica, i ceppi di referenza di *Pseudomonas fluorescens* sono stati suddivisi in 6 diversi gruppi al fine di disegnare in seguito dei *primer* per il saggio di *Real Time* PCR.

I raggruppamenti sono stati effettuati attraverso l'osservazione dell'albero e in molti casi sono stati associati tra di loro dei ceppi che presentavano un basso supporto di *bootstrap*: ad esempio il gruppo contenente DSM6, DSM12, DSM10, CECT2 e CECT3 è stato posto nello stesso gruppo (gruppo 1) di DSM11 in quanto il supporto di *bootstrap* è di solo 0,12.

I ceppi DSM7 e CECT5, putativamente possessori di due AprX, fanno parte di gruppi distinti.

4.15 Estrazione del DNA dai ceppi di referenza per la messa a punto del saggio *Real Time* PCR e quantificazione

Dai ceppi di referenza è stato estratto il DNA attraverso l'uso del kit commerciale *Invisorb Spin Tissue Mini Kit*. Dopo la quantificazione mediante NanoDrop® ND-100 sono state apprezzate delle buone rese, sia in termini di qualità che di quantità (dati non mostrati).

I calcoli dei rapporti tra le letture a $\lambda=260/\lambda=280$ e a $\lambda=260/\lambda=230$ hanno dato valori compresi tra 1,8 e 2,1, *range* nel quale si stima una buona purezza del DNA estratto.

4.16 Determinazione dell'efficienza del saggio *Real Time*

Nel presente studio, la messa a punto del saggio *Real Time* ha richiesto la determinazione dell'efficienza del metodo per assicurare una accurata quantificazione.

L'efficienza di amplificazione dei *primer* è stata determinata mediante la costruzione di rette *standard* utilizzando dieci diluizioni seriali per ognuno dei campioni processati: DSM6, DSM9, DSM10, DSM12, CECT2, CECT3, CECT4, rappresentanti di due diversi gruppi presenti nell'albero filogenetico ML, precedentemente descritto nel paragrafo 4.14.

L'amplificazione di questi 7 ceppi è avvenuta mediante i *primer* aprX_1_rt_f e aprX_1_rt_r per i campioni DSM6, DSM10, DSM12, CECT2 e CECT3. Per quanto riguarda i ceppi del gruppo 5, DSM9 è stato amplificato con i *primer* dedicati, mentre

per CECT4 sono stati utilizzati *primer* specifici, in quanto con i *primer* per il gruppo 5 non vi era una buona amplificazione e l'efficienza della retta era molto bassa.

Sono stati dunque utilizzati il *primer forward* aprxfragi_F [AATGGCAACCCTACTTACCG(20)] e il *primer reverse* aprxfragi_R [TGTTGGTGAAGTGCTGACC(19)].

Per ogni ceppo sono state ottenute le curve di amplificazione, dove i duplicati erano molto buoni. In figura 4.14 sono riportate le curve riferite al ceppo CECT3.

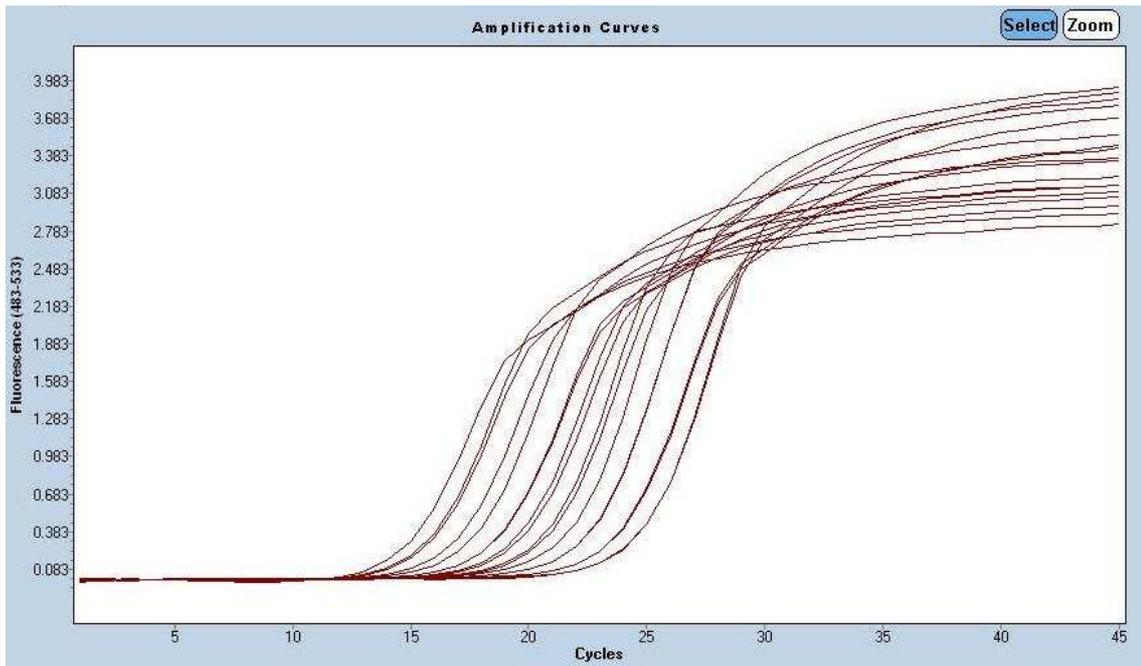


Figura 4.14: curve di amplificazione ottenute con le diluizioni seriali partendo dalla concentrazione di 2 ng/μl , riferite al ceppo CECT3.

Grazie alle curve sono state ottenute le rette *standard*, mediante il *software* dello strumento LightCycler® 480, per determinare l'efficienza di reazione. Un esempio di retta è riportato in figura 4.15.

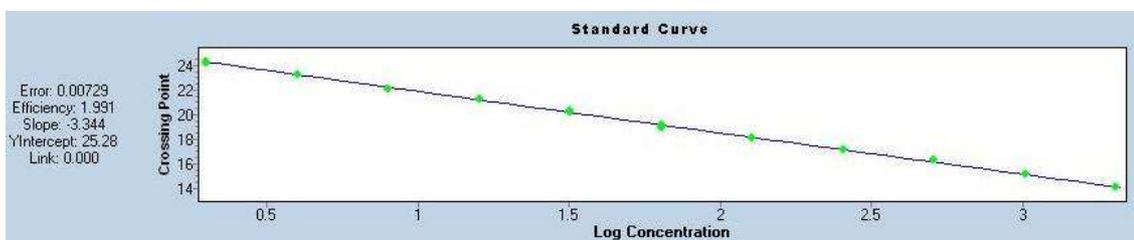


Figura 4.15: esempio di retta *standard* riferito al ceppo CECT3, in questo caso l'efficienza di reazione era 1,991.

Le efficienze delle rette erano le seguenti:

- DSM6: 1,980
- DSM9: 1,989
- DSM10: 2,067
- DSM12: 2,054
- CECT2: 1,996
- CECT3: 1,991
- CECT4: 2,051

Le efficienze erano dunque molto buone, infatti come norma generale più il valore si avvicina a 2, maggiore è l'efficienza della reazione.

Lo studio doveva procedere con l'analisi dell'espressione del gene *aprX* nei ceppi di riferimento inoculati nel latte, utilizzando il saggio messo a punto come descritto sopra. Purtroppo, nonostante ripetuti tentativi, la qualità dell'RNA estratto non era sufficientemente buona da permettere di ottenere dati accettabili dall'analisi in *Real Time* PCR. In laboratorio sono tuttora in corso prove per cercare migliorare la qualità dell'RNA estratto.

4.17 Valutazione del potenziale proteolitico nei ceppi di riferimento (saggio TNBS per la determinazione degli amminoacidi liberi)

I ceppi sui quali è stato disegnato il saggio *Real Time* PCR, sono stati valutati per la capacità proteolitica nel latte mediata della proteasi termoresistente AprX.

La presenza di attività proteasica termoresistente è stata effettuata seguendo la procedura riportata in letteratura (Marchand et al., 2008) per valutare l'attività nel latte dopo trattamento termico e conservazione a 37°C per due settimane.

I ceppi sono riportati nella tabella 3.10 del paragrafo 3.21.1 della sezione Materiali e Metodi.

4.17.1 Preparazione dei campioni

Durante la preparazione dei campioni è stata necessaria l'esecuzione di conte su piastra per determinare la crescita dei ceppi, in modo da operare delle corrette diluizioni seriali. Le conte sono state effettuate su terreno di coltura PCA ponendo le piastre a 22°C per alcuni giorni. Dall'analisi è emerso che tutti i ceppi avevano raggiunto una concentrazione di circa 10^8 UFC/ml. Le successive diluizioni seriali sono state condotte per ottenere una concentrazione finale di 10^3 UFC/ml.

4.17.2 Costruzione delle rette di taratura

Attraverso la preparazione degli *standard* di glicina in SDS 1% sono state costruite due rette di taratura: una per effettuare la lettura dei campioni prima del trattamento termico previsto dal protocollo e una per effettuare la lettura dei campioni a seguito della sterilizzazione e successiva incubazione a 37°C per due settimane.

Grazie alle rette, è stata ottenuta l'equazione (riportata nelle figure 3.2 e 3.3 nella sezione Materiali e Metodi) utile per risalire alle concentrazioni dei campioni di latte processati nel presente studio.

Di particolare interesse è anche il valore di R^2 , ovvero il coefficiente di determinazione, un parametro usato per stabilire fino a che punto l'equazione di regressione può essere usata per trovare un valore x conoscendo il valore y . R^2 può assumere valori compresi tra 0 e 1: se $R^2 = 1$ esiste una perfetta relazione lineare fra x ed y , per cui ad un determinato valore di x ne corrisponde uno solo di y .

Nel nostro caso il coefficiente di determinazione delle due rette era rispettivamente 0,9977 e 0,9964.

Inoltre, attraverso la radice quadrata del coefficiente di determinazione, si ottiene il coefficiente di correlazione: $r = \sqrt{R^2}$.

Il coefficiente di correlazione può assumere valori compresi tra -1 e +1; $r > 0,99$ è un indicatore di linearità. Nella prima retta è stato ottenuto $r = 0,9988$, mentre nella seconda retta $r = 0,9982$, quindi è stata ottenuta una buona linearità in entrambi i casi.

4.17.3 Valutazione degli amminoacidi liberi

La valutazione della capacità proteolitica di *Pseudomonas* nel latte è stata effettuata mediante il saggio TNBS in due momenti distinti: prima del trattamento termico e in seguito al trattamento termico dopo 2 settimane di incubazione a 37°C.

Ogni campione era presente nell'analisi in triplicato e per determinare l'assorbanza totale è stata eseguita la media di 5 letture distinte.

Per quanto riguarda il grado di proteolisi misurato prima dell'esecuzione del trattamento termico, i risultati di assorbanza sono stati riportati nella tabella 4.4.

Ceppo	Assorbanza
CECT229-1	0,0000
CECT229-2	0,0000
CECT229-3	0,0000
DSM6252-1	0,0000
DSM6252-2	0,0000
DSM6252-3	0,0000
DSM17489-1	0,0000
DSM17489-2	0,0000
DSM17489-3	0,0000
DSM17149-1	0,0000
DSM17149-2	0,0000
DSM17149-3	0,0000
DSM14020-1	0,0188
DSM14020-2	0,0172
DSM14020-3	0,0251
CECT378-1	0,1509
CECT378-2	0,1839
CECT378-3	0,0961
CECT446-1	0,0000
CECT446-2	0,0000
CECT446-3	0,0000

Tabella 4.4: assorbanze ottenute per ogni ceppo, ottenute dalla lettura allo spettrofotometro prima del trattamento termico

I dati presenti nella tabella si riferiscono a valori di assorbanza già moltiplicati per un fattore di diluizione 8. Come spiegato nella sezione Materiali e Metodi, i campioni di latte hanno infatti subito un ulteriore passaggio rispetto agli *standard* di glicina, che ha portato alla diluizione degli stessi.

Intercalando i risultati di assorbanza con l'equazione della retta ottenuta precedentemente, è stato possibile risalire alla concentrazione di equivalenti di glicina per litro. Gli unici ceppi che hanno mostrato attività proteolitica dopo l'incubazione a 5°C per 5 giorni sono stati DSM14020 e CECT378 e la loro attività proteolitica è stata

riassunta nella tabella 4.5 attraverso la quantificazione delle mmoli equivalenti di glicina presenti nel latte, ponendo come bianco il campione non inoculato.

Ceppo	equivalenti di glicina (mM)	mM media	σ
DSM14020-1	0,0053	0,007297491	0,005365
DSM14020-2	0,0032		
DSM14020-3	0,0134		
CECT378-1	0,1758	0,166379928	0,057185
CECT378-2	0,2183		
CECT378-3	0,1051		

Tabella 4.5: concentrazione in mM degli equivalenti di glicina presenti nel latte, dopo 5 giorni a 5°C, inoculato con i ceppi DSM14020 e CECT378, in triplicato. In tabella sono presenti la concentrazione media e il valore di deviazione standard (σ).

I dati sono stati successivamente posti in un istogramma, come descritto in figura 4.16.

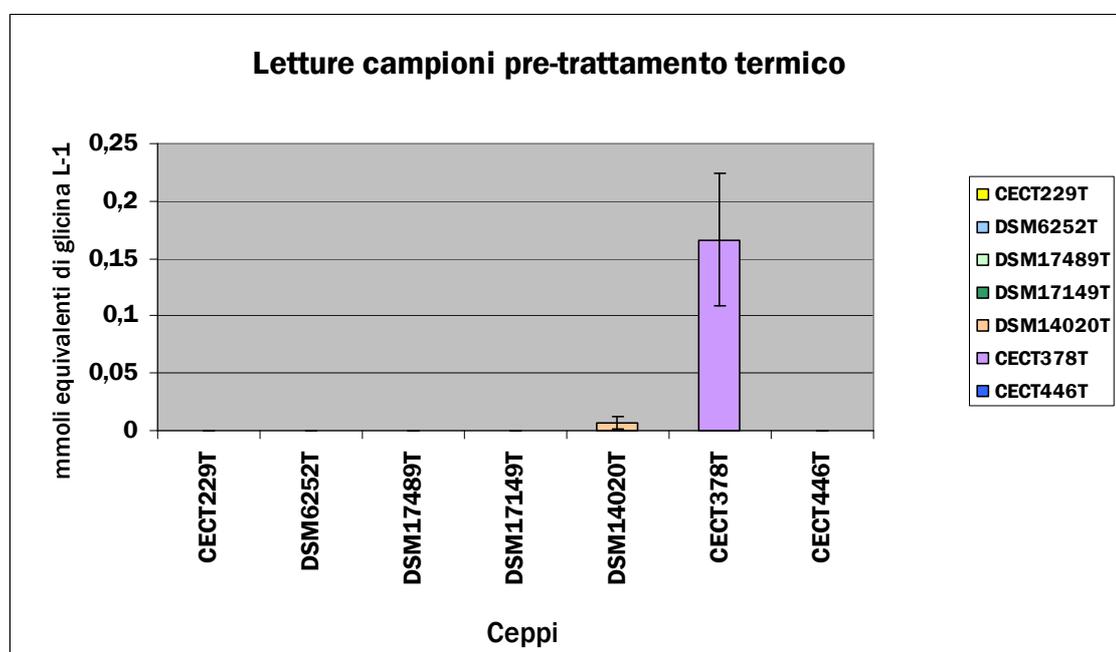


Figura 4.16: istogramma in cui è stata raffigurata l'attività proteolitica dei ceppi di *Pseudomonas fluorescens* testati mediante la quantificazione degli amminoacidi liberi (glicina) presenti nel latte dopo un'incubazione di 5 giorni a 5°C in presenza dei diversi ceppi.

Dal grafico è possibile apprezzare come la maggior parte dei campioni non ha prodotto attività proteolitica, ad eccezione di una lieve attività da parte del ceppo DSM14020 e del ceppo CECT3 che ha mostrato una discreta attività proteolitica con una quantità di glicina nel latte che variava da una concentrazione di circa 0,1 mM a 0,2 mM.

La valutazione della proteolisi *post* trattamento termico e a seguito di un'incubazione di 2 settimane a 37°C ha invece prodotto risultati ben più rilevanti.

Nella tabella 4.6 sono stati illustrati i valori di assorbanza.

Ceppo	Assorbanza
CECT229-1	0
CECT229-2	0
CECT229-3	0
DSM6252-1	0,1595
DSM6252-2	0,2082
DSM6252-3	0,1825
DSM17489-1	0,3722
DSM17489-2	0,3013
DSM17489-3	0,3404
DSM17149-1	0
DSM17149-2	0
DSM17149-3	0
DSM14020-1	0,1642
DSM14020-2	0,1672
DSM14020-3	0,1607
CECT378-1	0,3116
CECT378-2	0,3500
CECT378-3	0,2261
CECT446-1	0
CECT446-2	0
CECT446-3	0

Tabella 4.6: valori di assorbanza ottenuti per ogni ceppo dopo l'incubazione a 37°C per due settimane, a seguito del trattamento termico.

Intercalando i risultati ottenuti con l'equazione della retta *standard*, sono state ottenute le concentrazioni di glicina, riportate nella tabella 4.7.

Ceppo	equivalenti di glicina (mM)	mM media	σ
CECT229-1	0	0	0
CECT229-2	0		
CECT229-3	0		
DSM6252-1	0,18370772	0,214562	0,031452
DSM6252-2	0,246578879		
DSM6252-3	0,213400465		
DSM17489-1	0,458301059	0,414106	0,045846
DSM17489-2	0,366769946		
DSM17489-3	0,417247612		
DSM17149-1	0	0	0
DSM17149-2	0		
DSM17149-3	0		
DSM14020-1	0,189775368	0,18956	0,0042
DSM14020-2	0,193648335		
DSM14020-3	0,185256907		
CECT378-1	0,380067131	0,359799	0,08188
CECT378-2	0,429641105		
CECT378-3	0,269687581		
CECT446-1	0	0	0
CECT446-2	0		
CECT446-3	0		

Tabella 4.7: concentrazioni di glicina in mM presenti nel latte sottoposto al trattamento termico. Nella tabella sono riportati i valori medi e il valore di deviazione standard (σ).

I risultati sono stati in seguito posti nel grafico rappresentato in figura 4.17.

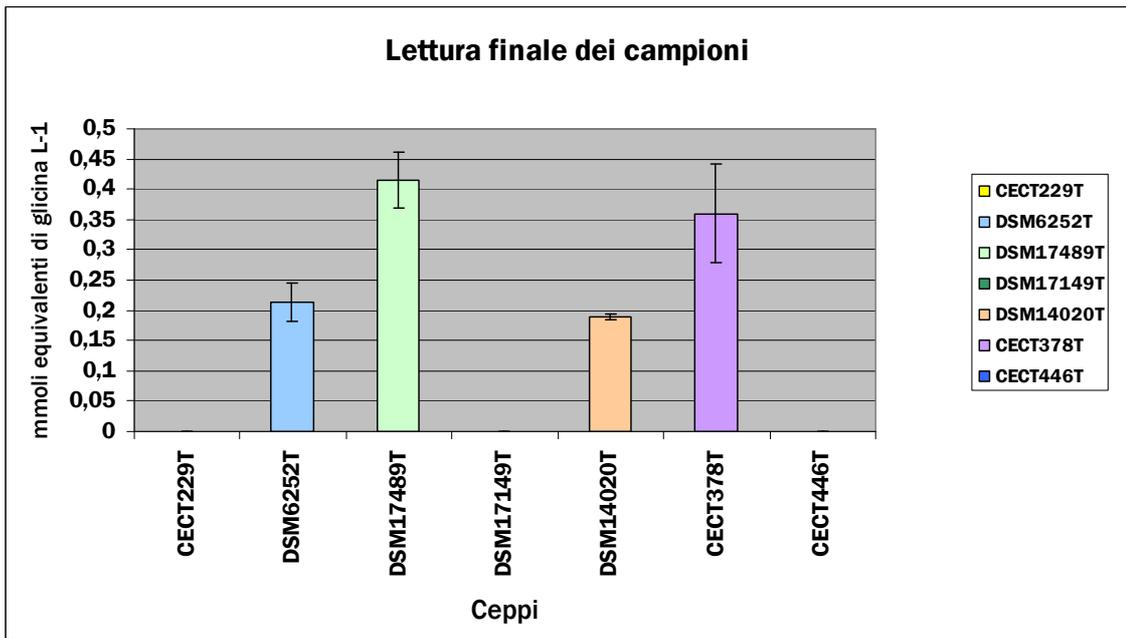


Figura 4.17: istogramma in cui è stata raffigurata l'attività proteolitica dei ceppi di *Pseudomonas fluorescens* mediante la quantificazione degli amminoacidi liberi (glicina) presenti nel latte dopo un'incubazione di 2 settimane a 37°C, a seguito del trattamento termico.

Dai risultati è emerso che i ceppi CECT446, DSM17149 e CECT229 non hanno prodotto attività proteolitica mediata dalla proteasi termoresistente AprX, in quanto dopo l'incubazione a 37°C non è stata rilevata una presenza di amminoacidi liberi maggiore nei campioni inoculati rispetto al bianco, che è stato posto come valore di riferimento zero.

La produzione di AprX è stata invece associata ai ceppi DSM6252, DSM17489, DSM14020 e CECT378 (questi ultimi due avevano già mostrato una maggiore proteolisi rispetto agli altri ceppi prima del trattamento termico).

Nel dettaglio, il ceppo CECT378 ha confermato l'alto grado di proteolisi già messo in evidenza prima del trattamento termico, mentre il ceppo DSM17489 ha mostrato un alto livello di proteolisi solo in seguito al trattamento termico. Questo è probabilmente dovuto alla grande produzione di AprX: gli enzimi hanno dunque aumentato la loro attività durante l'incubazione a 37°C.

5. DISCUSSIONE

Il genere *Pseudomonas* nel corso degli anni ha suscitato sempre maggiore interesse per quanto riguarda la capacità di alterare gli alimenti, soprattutto a seguito dei casi di “mozzarella blu” verificatisi a partire dal 2010 e dovuti alla presenza di batteri facenti parte dello *Pseudomonas fluorescens group*. Nella fattispecie, nell'*Annual Report of RASFF* del 2010, la colorazione anomala delle mozzarelle è stata attribuita a due specie appartenenti al sopra citato gruppo: *P. tolaasi* e *P. libanensis*.

Le alterazioni che questo batterio può generare sono tuttavia molteplici: non si tratta solo di una colorazione anomala dovuta alla produzione di un pigmento, ma anche di danni più classici come modificazioni organolettiche causate dalla produzione di svariati enzimi come proteasi, lipasi e lecitinasi (Dufour et al., 2008).

Data la natura psicotrofa di *Pseudomonas*, gli alimenti maggiormente a rischio sono quelli che fanno parte della catena del freddo: latte, prodotti lattiero-caseari, ma anche vegetali e carni.

Nel presente studio sono stati isolati ceppi di *P. fluorescens* da pancetta, la quale presentava una colorazione superficiale bluastra. In particolar modo, sono stati isolati i ceppi *P. lundensis* e *P. azotoformans*, già posseduti dal laboratorio e riconosciuti come ceppi di riferimento, e un nuovo ceppo che è stato sottoposto ad analisi più approfondite.

Partendo dalla matrice alimentare carne, in bibliografia sono presenti alcuni studi dove sono stati isolati ceppi di *Pseudomonas* da carne di pollame (Arnaut-Rollier et al., 1999) e carne di maiale (Chen et al., 1995). In particolar modo, nello studio di Arnaut-Rollier viene riscontrata presenza di *P. lundensis* come nel nostro caso, mentre nello studio di Chen viene riportata la capacità di questi ceppi di contrastare in modo efficace la crescita di batteri Gram positivi. Infatti, l'isolamento dei ceppi dalla pancetta processata in questo studio, ha portato all'identificazione, oltre al ceppo di *P. fluorescens*, di *Serratia* spp. (altro batterio Gram negativo), ma non di Gram positivi. Questa funzione antibiotica potrebbe essere dovuta alla natura biochimica del pigmento blu prodotto nell'alimento, infatti la famiglia di antibiotici più comunemente sintetizzata da *P. fluorescens* è quella delle fenazine, tra le quali fanno parte anche alcuni pigmenti come la piocianina. Tuttavia, ad oggi non è ancora disponibile una caratterizzazione della natura del pigmento stesso.

Un'altra ipotesi di inibizione degli altri microrganismi mediata dal pigmento può essere rappresentata dal fatto che si tratti di un sideroforo: la maggiore capacità di inglobare lo

ione ferro da parte delle pseudomonadi fluorescenti darebbe un vantaggio selettivo molto rilevante nei confronti degli altri ceppi eventualmente presenti nell'alimento.

Il nuovo ceppo di *Pseudomonas*, unitamente ad altri 2 nuovi ceppi provenienti dalla *School of Veterinary Science* dell'Università di Bristol, sono stati sottoposti ad una caratterizzazione fenotipica insieme a 18 *Type Strains* e ad altri 76 ceppi di campo presenti nella ceppoteca del laboratorio di Microbiologia degli Alimenti, i quali precedentemente erano stati caratterizzati dal punto di vista molecolare con la tecnica del *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

Con l'ausilio della stessa metodica sono stati caratterizzati anche i tre nuovi ceppi, al fine di implementare il *database* già in possesso del gruppo di ricerca. Grazie all'approccio MLST è infatti possibile ottenere in modo rapido ed economico un *pool* di sequenze che possono portare al riconoscimento del ceppo in modo univoco. Le sequenze possono inoltre essere condivise in uno specifico *database* disponibile *online* (<http://pubmlst.org/pfluorescens>).

Il metodo si è rivelato ottimo, infatti i ceppi sono stati discriminati con successo e sono stati identificati ben 98 diversi ST, segno evidente di una grande eterogeneità all'interno del *taxon*. Inoltre, solo due ST (ST26 e ST29) sono stati trovati simultaneamente in due ceppi differenti isolati da alimenti diversi.

La differenza nucleotidica (π), ovvero il numero medio di differenze nucleotidiche per sito da due sequenze selezionate casualmente per i diversi *loci* genomici, è alta (varia da 0,04467 di *rpoD* a 0,107562 di *gyrB*).

Un altro parametro esaminato è stato il *D-test* di Tajima, dove tutti i valori erano compresi tra 2 e -2, supportando l'ipotesi di selezione di tipo naturale come atteso, dato l'utilizzo di soli geni *housekeeping*.

E' stato poi ottenuto un albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* che mostrava una topologia molto simile a quella ottenuta dallo studio condotto da Mulet e colleghi del 2010, dove erano state affiancate le sequenze IST (*Internally Transcribed Spacer*) ai geni *housekeeping gyrB*, *rpoB* e *rpoD* (Mulet et al., 2010). Tra i due alberi filogenetici l'unica differenza è rappresentata dalla posizione di *P. fragi* che, alla luce del presente studio, fa parte di un ramo isolato rispetto agli altri ceppi.

Lo stesso risultato è stato ottenuto in uno studio basato sull'utilizzo dell'rRNA 16S (Peix et al., 2009), in uno in cui è stato utilizzato il solo gene *housekeeping rpoB* (Ait Tayeb et al., 2005) e in un lavoro in cui sono stati utilizzati i geni *oprI* e *oprL* (Matthijs et al., 2012).

Per quanto riguarda i test fenotipici, questi si sono basati sulla valutazione della produzione di pigmenti ed enzimi: i due fattori maggiormente implicati nelle alterazioni delle matrici alimentari.

Il genere *Pseudomonas* produce una vasta quantità di pigmenti, quali piocianina, pioverdina, fluoresceina, piorubina e piomelanina, tuttavia il pigmento riscontrato sulle “mozzarelle blu” sembra avere una natura diversa rispetto ai pigmenti dei quali conosciamo le caratteristiche.

Tra i pigmenti blu, quello rilevato nel presente studio ha somiglianza cromatica con quello prodotto da *Pseudomonas fluorescens biovar IV (P. lemonnieri)*, descritto per la prima volta da Hugo e colleghi nel 1958. Quest’ultimo non diffonde liberamente nel terreno di coltura, inoltre è fluorescente a seguito dell’esposizione ai raggi UV. Le stesse caratteristiche sono state evidenziate anche in uno studio condotto da Martin e colleghi nel 2011, in cui il pigmento era stato prodotto su PDA da *P. lemonnieri* alla temperatura di 31°C.

La molecola riscontrata nel presente studio ha invece caratteristiche fisico-chimiche nettamente diverse: diffonde su tutto il terreno di coltura, non emette fluorescenza ed è stata prodotta alle sole temperature di 6°C e 22°C. Il confronto tra le due tipologie di pigmento è riportato nella figura 5.1.

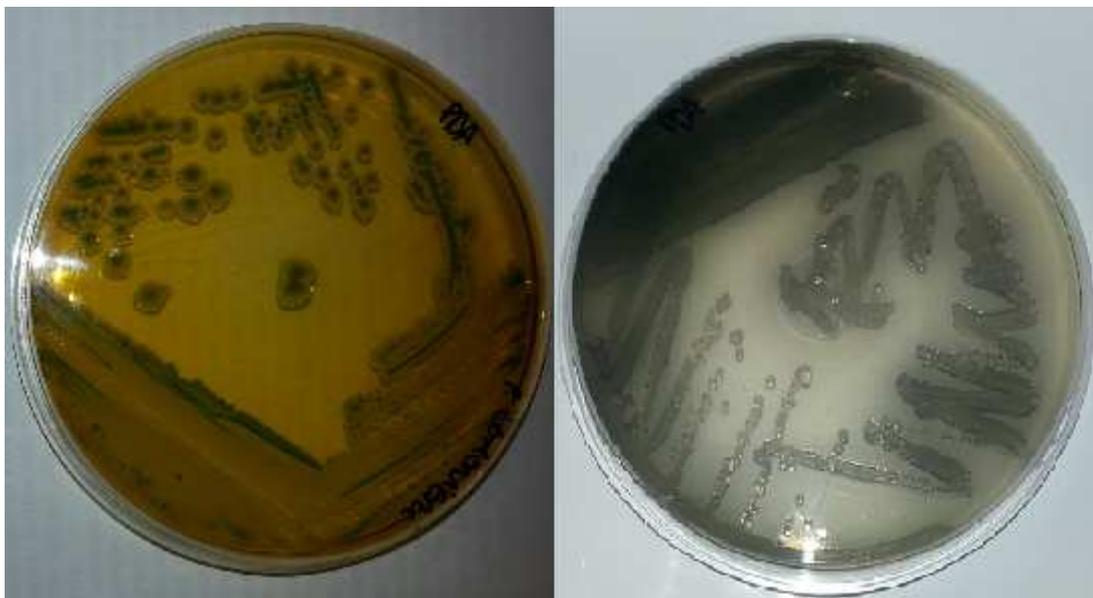


Figura 5.1: confronto tra la crescita di *P. lemonnieri* e del ceppo BB (Ps_79) su PDA. E’ possibile notare come la natura del pigmento sia molto differente: il pigmento di *P. lemonnieri* (immagine a sinistra) non diffonde sul terreno, come invece accade per il ceppo BB (immagine a destra).

Tali discrepanze inducono a pensare che il pigmento osservato nei ceppi processati sia diverso da quello prodotto da *P. lemonnieri*.

Il pigmento è stato prodotto su PDA, mentre non è stato osservato sui terreni NA con latte e EYA, probabilmente a causa della particolare composizione di questi due terreni, molto più “ricchi” rispetto al PDA.

Per quanto riguarda la produzione enzimatica, questa è stata testata sul terreno NA con 2% di latte ed è particolarmente marcata a 22°C (il 94,25% dei ceppi mostrano l’alone di chiarificazione attorno alle colonie). Questo dato conferma ciò che è riportato nello studio di Marchand e collaboratori del 2009.

Le attività lipolitica e lecitinasica non sono molto frequenti negli alimenti e da ceppo a ceppo sono dipendenti dalla temperatura. In particolar modo, non è stata rilevata attività lecitinasica del *Type Strain P. fragi* e dei ceppi di campo appartenenti allo stesso gruppo, confermando il risultato riportato in letteratura (Franzetti and Scarpellini, 2007).

Integrando i dati molecolari con i dati fenotipici, non risulta una correlazione tra gruppi diversi per quanto riguarda le attività enzimatiche e determinati gruppi filogenetici, mentre si evidenzia in modo molto spiccato che la produzione del pigmento blu è associata a ceppi appartenenti ad un unico ramo filogenetico.

All’interno di questo ramo si può notare che i ceppi Ps_77 e Ps_79 fanno parte di un sottogruppo indipendente che comprende anche il ceppo A506. Questi due ceppi, che provengono da regioni geografiche ben distinte, rispettivamente da Inghilterra e Italia, sono stati isolati da matrici carnee diverse (carne di manzo e pancetta di maiale).

Tuttavia, nel “ramo blu” mostrato in figura 5.2, non tutti i ceppi presenti hanno mostrato produzione del pigmento su PDA: si può ipotizzare che i ceppi Ps_20, Ps_33, Ps_40 e Ps_61 presentino all’interno del loro corredo genomico delle mutazioni nei geni implicati per la formazione della molecola blu. Ulteriori studi sono attualmente in corso in laboratorio per valutare questo aspetto.

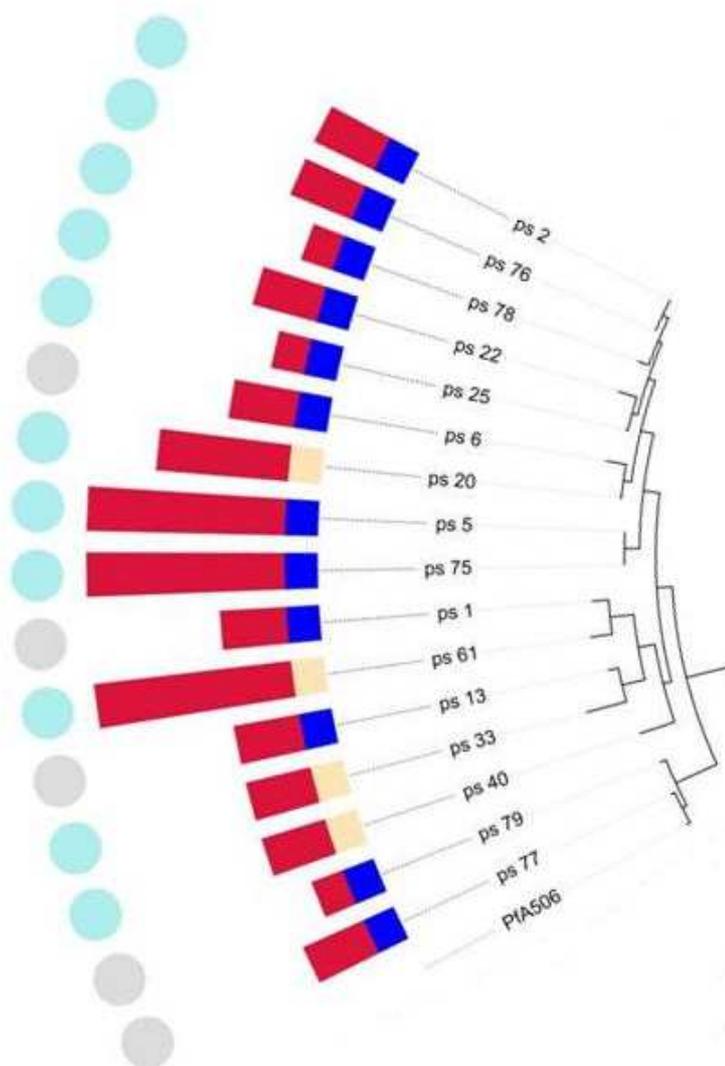


Figura 5.2: frammento dell'albero filogenetico di tipo *Maximum Likelihood* ottenuto attraverso l'allineamento delle sequenze concatenate, rappresentante il "ramo blu". All'interno di questo ramo sono contenuti tutti i ceppi produttori di pigmento blu, oltre a 4 ceppi che non lo producono.

Il ceppo di *Pseudomonas* isolato da pancetta (Ps_79 – BB) è stato inoltre sottoposto ad un *challenge test* in mozzarella per verificare la capacità di produzione del pigmento blu anche su di un alimento molto diverso rispetto a quello dal quale è stato isolato. Il risultato è stato estremamente positivo, infatti il pigmento è stato prodotto in larga quantità anche su mozzarella, la quale si è confermata un ottimo substrato per la formazione della molecola colorata. Va precisato che comunque la grande produzione di pigmento è avvenuta solo nel momento in cui l'alimento è stato esposto all'aria, indicando che la condizione di aerobiosi è necessaria per il viraggio di colore della matrice alimentare.

L'interesse della presente tesi si è poi spostato sullo studio di proteasi temoresistenti

prodotte dai ceppi appartenenti allo *Pseudomonas fluorescens group*. Questi batteri vengono in gran parte inattivati mediante pastorizzazione, tuttavia possono rilasciare nei prodotti alimentari delle proteasi, identificate nel prodotto del gene *aprX*, resistenti a trattamenti termici molto drastici (UHT). Queste proteasi possono dunque portare all'alterazione del prodotto con formazione di *off-flavours* sgraditi al consumatore (Chen et al., 2003).

Online sono disponibili, per i ceppi con i genomi interamente sequenziati, le sequenze codificanti *AprX*, metalloproteasi che fanno parte della famiglia delle serralisine, tipiche dei Gram negativi (Dufour et al., 2008). Grazie ad una ricerca condotta su un *database* proteico come Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), è stato possibile determinare che la proteasi *AprX* è composta da due principali subunità: Reprolisina-4 e Peptidasi M10. Di particolare interesse è quest'ultima subunità, la quale possiede una struttura terziaria molto simile a quella delle termolisine, ovvero delle metalloproteasi termoresistenti. E' dunque possibile ipotizzare che la termoresistenza di *AprX* possa essere dovuta alla conformazione spaziale.

Inoltre dalla letteratura possiamo apprendere che il gene *aprX* è all'interno di un operone nel quale sono presenti altre proteasi e lipasi, tutte sotto il controllo dello stesso promotore (Dufour et al., 2008).

Il gene *aprX* risulta essere presente in tutti i genomi di *Pseudomonas* analizzati, tuttavia la capacità di degradazione, dopo stress termico, sembra essere una caratteristica propria solo di alcuni ceppi. Altri ceppi invece sembrano possedere più di una *AprX*, come ad esempio *P. chlororaphis* (Baglinière et al., 2012) e *P. synxhanta* (Marchand et al., 2009).

Per tale motivo, in questo lavoro di tesi è stato messo a punto un saggio di *Real Time* PCR per andare a monitorare l'espressione del gene *aprX* nella matrice latte.

Per il momento sono stati disegnati i saggi che hanno mostrato di funzionare bene: i *primer* portano ad una corretta amplificazione e l'efficienza della reazione è molto buona per la maggior parte dei ceppi testati.

Lo *step* successivo sarà rappresentato dall'estrazione dell'RNA dai ceppi inoculati in latte e la successiva retro-trascrizione per ottenere il cDNA da utilizzare nel saggio *Real Time* PCR. Attualmente è in corso d'opera il miglioramento della metodica di estrazione, che si è rivelata difficoltosa vista la grande complessità della matrice in cui sono stati inoculati i ceppi, ovvero il latte.

Parallelamente è stato quantificato il grado di proteolisi attraverso la quantificazione

degli amminoacidi liberi presenti nel latte, a seguito dell'incubazione dello stesso con ceppi dello *Pseudomonas fluorescens group*, mediante il saggio enzimatico TNBS.

Il saggio TNBS è una metodica facile da eseguire, infatti si basa su una semplice lettura dei campioni allo spettrofotometro, tuttavia richiede un'accurata preparazione dei campioni per rendere la lettura stabile.

L'analisi è stata condotta dopo un'incubazione dei ceppi per 5 giorni a 5°C e in seguito al trattamento termico degli stessi campioni e successiva incubazione per due settimane a 37°C. In questo modo è stato possibile apprezzare che dopo la prima incubazione, solo 2 ceppi mostravano attività proteolitica: DSM14020T (*P. rhodesiae*) e, in modo ben più spiccato, CECT378T (*P. fluorescens*). Evidentemente, alle temperature di refrigerazione c'è bisogno di un maggior tempo di incubazione per determinare un importante grado di proteolisi.

Nella seconda lettura allo spettrofotometro, effettuata dopo il trattamento termico, che ha portato all'eliminazione dei batteri, e in seguito ad un'incubazione a 37°C per due settimane, l'attività proteolitica è stata osservata, oltre che per i due ceppi sopra citati, anche per DSM6252T (*P. lundensis*) e DSM17489T (*P. orientalis*).

Sono stati rilevati dunque due ceppi mediamente proteolitici (DSM6252T e DSM14020T), mentre gli altri due hanno un'attività proteolitica ben più spiccata (anche se va ricordato che CECT378T aveva già mostrato una grande proteolisi già nella precedente incubazione a 5°C).

L'attività proteolitica evidenziata dopo l'incubazione a 37°C è stata attribuita alla produzione di AprX, essendo stata rilevata a seguito del trattamento termico.

Di particolare interesse è stata la rilevazione dell'attività proteolitica di *P. lundensis*, responsabile delle maggiori alterazioni del latte (Marchand et al., 2009).

E' possibile ipotizzare che la capacità di questo ceppo di alterare il latte sia dovuta quasi ed esclusivamente alla produzione di AprX, infatti la proteolisi è stata rilevata solo a seguito dell'incubazione *post* trattamento termico e nella caratterizzazione fenotipica il ceppo non era apparso come proteolitico.

6. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto in questa tesi è stato utile per caratterizzare, sia dal punto di vista fenotipico che da quello genotipico, ceppi appartenenti al *taxon P. fluorescens*.

La tecnica MLST si è rivelata utile in modo particolare per la costruzione di un albero filogenetico che ha permesso di evidenziare una correlazione tra la produzione del pigmento blu e un definito *cluster* filogenetico. A tal proposito, come prospettiva futura, sarà interessante eseguire il sequenziamento dei genomi di alcuni ceppi per capire se il carattere “pigmento blu” è associato a determinate regioni geniche e se queste presentano delle mutazioni nei ceppi non produttori appartenenti allo stesso ramo filogenetico. Inoltre sarebbe interessante anche la caratterizzazione dal punto di vista biochimico del pigmento.

Per quanto riguarda la misurazione dell'espressione genica delle AprX partendo dalla matrice latte, il saggio di *Real Time* PCR si è rivelato funzionale, tuttavia è in corso il miglioramento della metodica per l'estrazione dell'RNA. Purtroppo le rese di estrazione e purezza sono attualmente troppo basse per condurre l'analisi in modo ottimale.

Grazie alla rilevazione dell'attività proteolitica è stato possibile apprezzare come i livelli di AprX variano da ceppo a ceppo e proprio per questo motivo ricopre ancor maggiore importanza la messa a punto della metodica di estrazione dell'RNA per poter effettuare il saggio *Real Time* PCR e misurare l'espressione genica di *aprX*, correlando il dato fenotipico.

BIBLIOGRAFIA

- Adler-Nissen, J. (1979). "Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6: 1256-1262.
- Ait Tayeb, L., Ageron, E., Grimont, F., Grimond P.A.D. (2005). "Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on *rpoB* sequences and application for the identification of isolates". *Research in Microbiology*, 156: 763–773
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H. and Oyazu, H. (2000). "Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1563-1589.
- Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D.L., Devriese, L.A., De Zutter, L. and Van Hoof, J. (1999). "A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat". *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 15-28.
- Arslan, S., Eyi, A. and Ozdemir, F. (2011). "Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from cheeses". *Journal of Dairy Science*, 94: 5851-5856.
- Baglinière, F., Tanguy, G., Jardin, J., Matéos, A., Briand, V., Rousseau, F., Robert, B., Beaucher, E., Humbert, G., Dary, A., Gaillard, J.L., Amiel, C., Gaucheron, F. (2012). "Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage". *Food Chemistry*, 135: 2593-2603
- Bilhere, E., Lucas, P.M., Claisse, O. and Lonvaud-Funel, A. (2009). "Multilocus Sequence Typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped

- by intergenic recombination". *Applied and environmental microbiology*, 1291-1300.
- Chen, C.M., Doyle, M.P., Luchansky, J.B. (1995). "Identification of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from raw pork and chicken that produce siderophores antagonistic towards foodborne pathogens". *Journal of Food Protection*, 58(12): 1340-1345.
- Chen, J., Chen, Q., Jiang, L., Cheng, C., Bai, F., Wang, J., Mo, F. and Fang, W. (2010). "Internalin profiling and multilocus sequence typing suggest four *Listeria innocua* subgroups with different evolutionary distances from *Listeria monocytogenes*". *BMC Microbiology*, 10:97.
- Chen L., Daniel R.M., Coolbear, T. (2003). "Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders". *International Dairy Journal*, 7 (9): 255-275
- Consoli, M., Losio, M.N., Bertasi, B., Panteghini, C., Ferrari, M., Mioni, R., Decastelli, L. and Varisco, G. (2010). "Ribotipizzazione di ceppi di *Pseudomonas fluorescens* isolati da mozzarella". *XII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, 197: 198.
- Cox, C.D. and Adams, P. (1985). "Siderophore activity of Pyoverdine for *Pseudomonas aeruginosa*". *Infection and Immunity*, 130-138.
- De Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P. and Heyndrick, M. (2011). "Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk". *Applied and environmental microbiology*, 77: 460-470.
- Deletoile, A., Passet, V., Aires, J., Chambaud, I., Butel M.J., Smokvina, T. and Brisse, S. (2010). "Species delineation and clonal diversity in four *Bifidobacterium* species as revealed by multilocus sequencing". *Research in Microbiology*, 1-9.

- Den Dooren de Jong, L.E. (1926). "Bijdrage tot de kennis van het mineralisatieproces". Rotterdam, The Netherlands: *Nijgh & van Ditmar Uitgevers-Mij*.
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G., Gaillard, J.L. and Dary, A. (2008). "Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them". *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 188-196.
- Franzetti, L. and Scarpellini, M. (2007). "Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods". *Annals of Microbiology*, 57 (1): 39-47.
- Gennari, M., and Dragotto, F. (1992). "A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water". *Journal of Applied Bacteriology*, 72 (4): 281–8.
- Gershman, M.D., Kennedy, D.J., Noble-Wang, J., Kim, C., Gullion, J., Kacica, M., Jensen, B., Pascoe, N., Saiman, L., McHale, J., Wilkins, M., Schoonmaker-Bopp, D., Clayton, J., Arduino, M., and Srinivasan, A. (2008). "Multistate Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream 65 infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy". *Clinical Infectious Diseases*, 47: 1372–9.
- Gonçalves, L. S. A., Rodrigues, R., Amaral Júnior, A.T., Karasawa, M. and Sudré, C.P. (2008). "Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions". *Genetics and Molecular Research*, 7(4): 1289-1297.
- Gower, J.C. (1971). "A general coefficient of similarity and some of its properties". *Biometrics*, 27(4): 623-637.
- Guanhao, B., Yongkang, L., Ying, Z. and Fushang, C. (2010). "Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2015–2020

- Habeeb, A.F.S.A. (1966). "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid". *Analytical Biochemistry*, 14: 328-336.
- Haynes, W.C., and Burkholder, W.H. (1957). "Genus I. *Pseudomonas* Migula, 1894". *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th edn. Breed, R.S., Murray, E.G.D., and Smith, N.R. (eds). Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, 89–152.
- Hilario, H., Buckley, R.T. and Young, J.M. (2004). "Improved resolution on the phylogentic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA". *Antoine van Leewenhoek*, 86, 51-64.
- Hugo, W.B. and Turner, M. (1956). "A soil bacterium producing an unusual blue pigment". *Journal of Bacteriology*, 73: 154-157.
- Johnsen, K., Andersen, S. and Jacobsen, C.S. (1996). "Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars". *Applied and environmental microbiology*, Oct. 1996, 3818-3825.
- Loper, J.E. (1988). "Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain". *Disease control and Pest Management, Phytopathology*, 166-172.
- Marchand S., Coudijzer K., Heyndrickx M., Dewettinck K., De Block J. (2008). "Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk". *International Dairy Journal*, 18: 514-519
- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer, K., De Jonghe, V., Dewettinck, K., De Vos, P., Devreese, B., Heyndrickx, M. and De Block, J. (2009). "Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species". *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2): 68-77.

- Martin, N.H., Murphy, S.C., Ralyea, R.D., Wiedmann, M. and Boor, K.J. (2011). "When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage". *Journal of Dairy Science*, 94 :3176-3183.
- Matthijs, S., Coorevits, A., Gebrekidan, T.T., Tricot, C., Wauven, C.V., Pirnay, J.P., De Vos, P. and Cornelis, P. (2012). "Evaluation of oprI and oprL genes as molecular markers for the genus *Pseudomonas* and their use in studying the biodiversity of a small Belgian River". *Research in Microbiology*, 163(3): 254-261
- Meer, R.R., Bakker, J., Bodyfelt, F.W. and Griffiths M.W. (1991). "Psychotrophic *Bacillus* spp. In fluid milk products: a review". *Journal of Food Protection*, 54: 969-979.
- Meiden, M.J.C (2006). "Multilocus Sequence Typing of Bacteria". *Annual Review of Microbiology*, 60: 561–88.
- Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. and Palleroni, N.J. (2002). "Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent e nonfluorescent Pseudomonads". *Applied and Environmental Microbiology*, 2745-2753.
- Migula, W. (1894). "Über ein neues System der Bakterien". *Arbeiten aus dem bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*, 235–328.
- Mossialos, D., Meyer, J.M., Budzikiewicz, H., Wolff, U., Koedam, N., Baysse, C., Anjaiah, V. & Cornelis, P. (2000). "Quinolobactin, a new siderophore of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine". *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 487–492.
- Mulet, M., Bennassar, A., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E. (2009). "An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their

- detection in environmental samples". *Molecular and Cellular Probes*, 23: 140-147
- Mulet, M., Lalucat, J. and Garcia-Valdes, E. (2010). "DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species". *Environmental Microbiology*, 12(6): 1513-1530.
- Nadkarni, M.A., Martin, F.E., Jacques, N.A. and Hunter, N. (2002). "Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set". *Microbiology*, 257-266
- Nogarol, C., Bianchi, D.M., Vencia, W., Losio, M.N., Zuccon, F. and Decastelli, L. (2010). "Caratterizzazione molecolare di isolati di *Pseudomonas fluorescens* da prodotti lattierocaseari: ottimizzazione di un protocollo PFGE". XII *Congresso Nazionale S.I.Di.L.V.*, 119: 120.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M. (1973). "Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23: 333-339.
- Palleroni, N.J. (1984). "Genus I. *Pseudomonas* Migula 1984, 237^{AL}". *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1: 141-199.
- Palleroni, N.J. (2010). "The *Pseudomonas* story". *Environmental Microbiology*, 12(6): 1477-1383.
- Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H., Velazquez, E. (2009). "Historical evolution and current status of taxonomy of genus *Pseudomonas*". *Infection Genetics and Evolution*, 9: 1132-1147
- Pineda, F.J., Antoine, M.D., Demirev, P.A., Feldman, A.B., Jackman, J., Longenecker, M., Lin, J.S. (2003). "Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers". *Analytical Chemistry*, 75: 3817-3822.

- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R., Waites, W.M. (2002). “Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage”. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 205-213.
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2010). *Annual Report*.
- Rossignol, G., Merieau, A., Guerillon, J., Veron, W., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N. (2008). “Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens*”. *BMC microbiology*, 2008, 8-189.
- Sørhaug, T. and Stephaniak, L. (1997). “Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects”. *Trends in Food Science and Technology*, 81: 35 – 41.
- Spiers, A.J., Buckling, A., and Rainey, P.B. (2000). “The causes of *Pseudomonas* diversity”. *Microbiology*, 146: 2345–2350.
- Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D.L., Jackson, R.W., Vivian, A. and Harayama, S. (2000). “Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes”. *Microbiology*, 146: 2385-2394.

Ringraziamenti

Sono passati ben 2 anni dall'inizio di questa nuova avventura universitaria e ritengo doveroso ricordare le persone che mi sono state accanto e mi hanno permesso di crescere come persona e a livello professionale.

Desidero innanzitutto ringraziare la Dott.ssa Barbara Cardazzo per avermi dato l'opportunità di sviluppare questa tesi, per la fiducia fin da subito dimostrata nei miei confronti e per avermi seguito durante lo svolgimento di questo lavoro.

Un grande ringraziamento va anche a Nadia, che mi ha supportato e aiutato nel lavoro di tesi con grande disponibilità, gentilezza e simpatia, facendomi sentire parte integrante di un progetto ben più importante di una semplice tesi.

Inoltre un grazie va anche a Lisa, Luca e Maria Elena e a tutti coloro che mi hanno dimostrato grande disponibilità con preziosi consigli e insegnamenti.

Ringrazio tutti gli amici che mi sono sempre stati vicini in questi 2 anni e che mi hanno regalato risate e spensieratezza anche nei momenti difficili, su tutti Alain, Alessandra, Alessandro, Thomas...ed in particolar modo Riccardo.

Ringrazio in modo speciale Anna per aver condiviso con me questa avventura a 360° e avermi aiutato a dare sempre il meglio di me stesso: è anche grazie a lei se ora posso festeggiare un traguardo così importante.

Il grazie più grande va però alla mia famiglia, mamma e papà, che hanno sempre creduto in me anche quando nessuno avrebbe scommesso un solo centesimo sulla mia persona, me compreso. Alla fine hanno vinto loro, hanno avuto ragione. Grazie di cuore.