



# UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E  
AMBIENTALI

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Sopravvivenza di ceppi probiotici di *Bacillus  
clausii* in larve di *Tenebrio molitor*

Survival of probiotic strains of *Bacillus clausii* in  
*Tenebrio molitor* larvae

**Tesi di Laurea di:**  
Alessia Marotta

**Relatore:**  
Prof.ssa Lucia Aquilanti

**Correlatore:**  
Dott. Vesna Milanović

Sessione Autunnale

---

**Anno Accademico 2017-18**

# SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	1
ELENCO DELLE FIGURE.....	2
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Microrganismi probiotici.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. <i>Bacillus clausii</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. <i>Bacillus coagulans</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. <i>Bacillus subtilis</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. Insetti edibili: opportunità per la nutrizione umana.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6. Rischi associati al consumo di insetti.....</b>	<b>9</b>
<b>1.7. <i>Tenebrio molitor</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>2. SCOPO DEL LAVORO.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Mantenimento di larve di <i>T. molitor</i> in farinaccio inoculato con ceppi probiotici di <i>B. clausii</i>.....</b>	<b>15</b>
3.1.1.Reperimento e coltivazione di ceppi probiotici di <i>Bacillus clausii</i> .....	15
3.1.2.Preparazione dell'inoculo.....	16
3.1.3.Inoculo del farinaccio con <i>B. clausii</i> .....	17
3.1.4.Allevamento di larve di <i>T. molitor</i> su farinaccio inoculato con <i>B. clausii</i> .....	17
3.1.5.Campionamento.....	19
<b>3.2. Costruzione delle curve standard.....</b>	<b>20</b>
3.2.1.Estrazione di DNA batterico.....	20
3.2.2.Preparazione delle soluzioni standard di DNA.....	21
3.2.3.PCR quantitativa (qPCR).....	23
<b>3.3. Quantizzazione di <i>B. clausii</i> in farinaccio e larve via PCR quantitativa (qPCR).....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Analisi semi-quantitativa per la determinazione della vitalità di <i>B. clausii</i> nelle larve di <i>T. molitor</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5. Analisi statistica.....</b>	<b>26</b>
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Valutazione dei terreni di coltura.....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Curve standard.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3. Determinazione della quantità di <i>B. clausii</i> nelle larve di <i>T. molitor</i> e nel farinaccio.....</b>	<b>32</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>38</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>40</b>
<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>43</b>

## ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1.1: Valori nutrizionali di larve di <i>T. molitor</i> (Kourimska e Adamkova, 2016).....	11
Tabella 3.1: Composizione del terreno di coltura PCA ( <i>Plate Count Agar</i> ).....	15
Tabella 3.2: Composizione del terreno di coltura MH ( <i>Mueller Hinton</i> ) agar.....	15
Tabella 3.3: Composizione del terreno di coltura LB ( <i>Luria-Bertani</i> ) agar.....	15
Tabella 3.4: Composizione del terreno di coltura BHI ( <i>Brain Heart Infusion</i> ) agar.....	16
Tabella 3.5: I primer specifici utilizzati per l'amplificazione del gene erm34.....	23
Tabella 3.6: Composizione della miscela di amplificazione del gene erm34.....	23
Tabella 4.1: Risultati delle conte vitali di <i>B. clausii</i> effettuate su quattro diversi terreni di coltura, espressi come valore medio UFC/mL.....	28
Tabella 4.2: Risultati della conta vitale di <i>B. clausii</i> su BHI agar e MH agar.....	32
Tabella 4.3: Risultati dell'analisi qPCR espressi come media delle tre repliche analitiche in Log cellule/g $\pm$ deviazione standard.....	33
Tabella 4.4: Analisi statistica sui risultati medi delle tre repliche analitiche e biologiche espressi in Log(cellule/g) $\pm$ deviazione standard.....	35
Tabella 4.5: Risultati dell'analisi qPCR dei campioni di larve liofilizzate espressi come media del triplo tecnico in Log cellule/g $\pm$ deviazione standard.....	36
Tabella 4.6: Risultati della determinazione della vitalità ed eventuale sporificazione di <i>B. clausii</i> in larve di <i>T. molitor</i> .....	36

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 3.1: Vaschette di alluminio contenenti farinaccio con: pannello a: cellule vegetative di ceppi probiotici di <i>B. clausii</i> ; pannello b: cellule vegetative di ceppi di <i>B. clausii</i> e larve di <i>T. molitor</i> .....	18
Figura 3.2: Substrato utilizzato per l'allevamento di larve di <i>T. molitor</i> , costituito da farinaccio e carote a fette.....	18
Figura 3.3: Lavaggio delle larve di <i>T. molitor</i> con una soluzione acquosa di etanolo al 70 % (v/v).....	19
Figura 3.4: Diluizioni seriali decimali del DNA estratto dalle spore di <i>B. clausii</i> contenute in 150 µL di Enterogermina 2 miliardi/ 5 mL (Sanofi).....	21
Figura 3.5: Diluizioni seriali decimali del DNA estratto dalle cellule vegetative di <i>B. clausii</i> contenute in 300 µL di sospensione cellulare di <i>B. clausii</i> .....	21
Figura 3.6: Sospensioni di DNA estratto da farinaccio inoculato con spore di <i>B. clausii</i> per la costruzione delle curve standard.....	22
Figura 3.7: Sospensioni di DNA estratto da farinaccio inoculato con cellule vegetative di <i>B. clausii</i> per la costruzione delle curve standard.....	22
Figura 3.8: Il ciclo termico per la amplificazione del gene <i>erm34</i> di <i>B. clausii</i> via PCR quantitativa (qPCR).....	24
Figura 4.1: Curva standard costruita con il a) DNA estratto dalle spore di <i>B. clausii</i> contenute in Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi); b) DNA estratto dalle cellule vegetative di <i>B. clausii</i> ; c) DNA estratto da farinaccio sterile inoculato con spore di <i>B. clausii</i> ; d) DNA estratto da farinaccio sterile inoculato con cellule vegetative di <i>B. clausii</i> .....	30
Figura 4.2: Curve di <i>melting</i> ottenute dagli ampliconi del DNA estratto da a) spore di <i>B. clausii</i> contenute in Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi); b) cellule vegetative di <i>B. clausii</i> ; c) spore di <i>B. clausii</i> contenute nel farinaccio inoculato; d) cellule vegetative di <i>B. clausii</i> contenute nel farinaccio inoculato.....	31

# **1. INTRODUZIONE**

### 1.1. Microrganismi probiotici

Le specie batteriche che abitano il tratto gastro-intestinale dell'uomo sono molteplici; nelle feci, in particolare, possono essere raggiunte cariche rilevanti pari a  $10^{12}$  cellule per grammo. I microrganismi che costituiscono la microflora intestinale contribuiscono alla difesa dell'ospite attraverso una serie di meccanismi, tra i quali, ad esempio, l'effetto barriera legato alla colonizzazione dell'epitelio intestinale, a sua volta correlata a una limitazione dell'adesione di eventuali microrganismi patogeni in transito nell'intestino.

Ciò spiega come l'integrazione della microflora intestinale con microrganismi benefici attraverso l'ingestione di alimenti, bevande o integratori alimentari contenenti **probiotici** possa promuovere la salute dell'ospite. I microrganismi probiotici sono, per definizione, microrganismi in grado di conferire uno o più benefici quando vengono somministrati in adeguate quantità (Cutting, 2011). I probiotici che troviamo negli alimenti, per poter garantire l'apporto di uno o più benefici all'ospite, devono raggiungere l'intestino vivi e vitali, aderire e, quindi, colonizzare l'epitelio intestinale. Di conseguenza, essi devono superare le barriere naturali, rappresentate dai succhi gastrici dello stomaco e dai sali biliari dell'intestino e avere anche la capacità di moltiplicarsi nelle condizioni chimico-fisiche caratteristiche di tale particolare ecosistema (Food and Agriculture Organization e World Health Organization, 2001).

I meccanismi con i quali i probiotici procurano benefici all'ospite variano da un probiotico all'altro e possono includere:

- la produzione di uno o più metaboliti specifici (es.: batteriocine) in grado di agire direttamente sugli eventuali patogeni presenti nel tratto gastro-intestinale;
- la produzione di enzimi con funzioni utili per l'organismo umano (es.:  $\beta$ -galattosidasi, capaci di scindere il lattosio, facilitandone la digestione);
- la competizione, con eventuali microrganismi patogeni, per i nutrienti e/o i siti di adesione dell'epitelio intestinale;
- la modulazione del sistema immunitario.

In Europa, i microrganismi impiegati come probiotici negli alimenti o integratori alimentari per uso umano devono essere inclusi nell'elenco dei microrganismi QPS (*Qualified Presumption of Safety*) definito dall'EFSA (*European Food Safety Authority*), cioè devono essere sicuri (quindi non patogeni) e non essere privi di antibiotico-resistenze trasmissibili

## Introduzione

(Ministero della salute, 2018). Nell'ultimo decennio, il numero di alimenti e bevande probiotiche presenti sul mercato è notevolmente aumentato; tali prodotti sono principalmente ottenuti utilizzando ceppi selezionati di batteri Gram-positivi, in particolare ascritti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Tuttavia, il numero di specie entro le quali sono stati individuati ceppi probiotici è ben più ampio, includendo lieviti e batteri sporigeni (Food and Agriculture Organization e World Health Organization, 2001).

Relativamente agli sporigeni, i ceppi ad oggi più utilizzati sono ascritti al genere *Bacillus*. La sporulazione è un processo di differenziazione cellulare che permette alle cellule vegetative di poter sopravvivere in condizioni ambientali estreme che ne causerebbero la loro morte. Questo processo si attiva, ad esempio, quando la cellula in forma vegetativa si trova in un ambiente in cui la concentrazione dei nutrienti non è sufficiente per il suo sviluppo. Le spore batteriche sono, inoltre, note per l'elevata resistenza al calore e a bassi valori di pH; quest'ultima caratteristica consente a tale microrganismi di superare lo stomaco e raggiungere, in concentrazioni adeguate, l'intestino dove possono germinare ed esercitare la propria azione probiotica (Cutting, 2011).

I microrganismi del genere *Bacillus* svolgono funzioni benefiche attraverso l'immuno-modulazione, cioè la regolazione del sistema immunitario favorendone e aumentandone l'attività, la competizione con i patogeni gastrointestinali per i siti di adesione e la secrezione di composti antimicrobici. Se assunti in adeguate quantità, tali probiotici favoriscono la prevenzione di disturbi gastrointestinali (es.: diarrea e sindrome dell'intestino irritabile) e respiratori, allergie e cancro. Nonostante i bacilli siano ben integrati nella microflora intestinale dell'uomo, è comunque necessario valutare la sicurezza di questi microrganismi prima del loro impiego in campo alimentare, al fine di evitare che questi possano essere fonte di infezione o intossicazione alimentare (Lakshmi, et al., 2017).

Le specie probiotiche del genere *Bacillus* di maggior interesse per la produzione di alimenti o integratori alimentari per uso umano sono *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus subtilis* (Cutting, 2011).

## 1.2. *Bacillus clausii*

*Bacillus clausii* è un microrganismo appartenente alla famiglia Bacillaceae, Gram-positivo, a forma di bastoncino e sporigeno (Urdaci, et al., 2004). Gli studi ad oggi condotti su questa specie hanno permesso di valutarne gli effetti benefici sulla salute umana. Durante la sporulazione, che avviene nella fase stazionaria, il microrganismo rilascia nel mezzo sostanze antimicrobiche attive contro alcuni batteri Gram-positivi, quali *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium* ssp. (Urdaci, et al., 2004).

Un aspetto molto importante legato alla fisiologia di questa specie è rappresentato dalla resistenza agli antibiotici, particolarmente studiata in quattro ceppi di *B. clausii*, contenuti nelle preparazioni farmaceutiche di “Enterogermina” (Gemmellaro, 2019) che, infatti, sono stati denominati sulla base della resistenza a diversi antibiotici:

- ceppo O/C, resistente al cloramfenicolo;
- ceppo N/R, resistente alla novobiocina e alla rifampicina;
- ceppo T, resistente alla tetraciclina;
- ceppo SIN, resistente alla neomicina e alla streptomina.

Poiché la somministrazione di microrganismi resistenti agli antibiotici può rappresentare un potenziale pericolo, se tale resistenza viene trasferita a microrganismi patogeni per l'uomo, i ceppi probiotici di *B. clausii* utilizzati a livello commerciale sono stati valutati preliminarmente per il rischio di mobilità dei geni di resistenza. Gli studi ad oggi condotti hanno dimostrato che questi ceppi sono stabili e incapaci di trasferire tali geni (Bozdogan, et al., 2004).

Le preparazioni commerciali di Enterogermina possono contenere fino a  $2 \times 10^9$  spore per 5 mL di sospensione (Cutting, 2011). Tali spore germinano a livello del digiuno e dell'ileo, due specifici tratti dell'apparato gastro-intestinale umano.

La somministrazione di Enterogermina è consigliata in associazione ai trattamenti antibiotici orali, allo scopo di ripristinare la flora intestinale e di favorire al contempo la immunostimolazione e l'aumento della secrezione di immunoglobuline A (Bozdogan, et al., 2004). In aggiunta, questo medicinale è utilizzato per il trattamento della diarrea e per prevenire le malattie gastrointestinali infettive (Gemmellaro, 2019).



### **1.3. *Bacillus coagulans***

Questa specie di *Bacillus* utilizzata come probiotico rientra nella lista dei microrganismi riconosciuti come GRAS (*Generally Recognized As Safe*) dalla FDA (*Food and Drug Administration*) negli USA e QPS (*Qualified Presumption of Safety*), dall'EFSA (*European Food Safety Authority*) in Europa. Oltre alla sua capacità di secernere una batteriocina, la coagulina, efficace contro un ampio spettro di microrganismi enterici, *B. coagulans* viene utilizzato come probiotico negli alimenti sottoposti a blandi trattamenti termici grazie alla sua stabilità in forma di spora (Cutting, 2011).

### **1.4. *Bacillus subtilis***

Alcuni autori hanno suggerito effetti benefici legati all'utilizzo di *Bacillus subtilis* come integratore probiotico per il consumo umano, in quanto questo microrganismo è in grado di produrre sostanze antimicrobiche, stimolare il sistema immunitario e favorire il miglioramento complessivo della microflora intestinale umana (Lefevre, et al., 2017). In particolare, ulteriori studi hanno dimostrato che la somministrazione orale di spore di *B. subtilis* riduce le infezioni legate a *Salmonella enterica* sierotipo Enteritidis, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (Cutting, 2011).

### **1.5. Insetti edibili: opportunità per la nutrizione umana**

La popolazione mondiale è in continua crescita e attualmente ammonta a 7,7 miliardi di persone (Dadax, 2019). La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nation*) stima che nel 2050 la popolazione mondiale raggiungerà circa i 9 miliardi di persone. Di conseguenza si andrà incontro inevitabilmente ad un aumento della domanda globale di cibo, in particolare degli alimenti a base di carne che rappresentano la fonte principale di proteine animali. Ciò implicherà un aumento della produttività degli allevamenti, aumento tuttavia condizionato dal fatto che gli spazi disponibili per queste attività sono limitati.

Una fonte alternativa alle proteine animali della carne è rappresentata dagli insetti. Dal punto di vista della sostenibilità ambientale, l'impatto che gli allevamenti di carne hanno sull'ambiente rispetto a quelli di insetti è di gran lunga maggiore, in quanto i primi sono responsabili del 18% delle emissioni di gas serra globali e di un elevato consumo di acqua. Infatti, per produrre 1 Kg di proteine animali sono necessari volumi di acqua dalle 5 alle 20 volte superiori di quelli necessari per la produzione di 1 Kg di proteine vegetali. Allevare insetti si traduce, quindi, in minori emissioni di gas serra, minor consumo di acqua e minor spazio occupato dalle attività di allevamento, produzione e trasformazione degli insetti. Altri vantaggi dell'allevamento di insetti come fonte proteica sono rappresentati dall'elevata efficienza dell'insetto di convertire i substrati di crescita in massa corporea e dalla possibilità di impiegare scarti dell'industria agroalimentare come mangimi.

Il valore nutrizionale degli insetti è molto variabile a seconda della specie, ma anche all'interno della specie questo varia in funzione di diversi fattori che comprendono lo stadio di sviluppo, la dieta e le condizioni ambientali di allevamento. Esso, inoltre, varia in base alla tipologia di preparazione e lavorazione a cui gli insetti vengono sottoposti prima del consumo, quali l'essiccamento, la liofilizzazione e la cottura.

Dal punto di vista nutrizionale gli insetti sono fonte di energia, proteine, amminoacidi essenziali, acidi grassi mono e polinsaturi; per l'elevato contenuto di chitina, essi sono, inoltre, fonte di fibre e ricchi di micronutrienti come rame, ferro, magnesio, fosforo e zinco e di vitamine come riboflavina, acido pantotenico, biotina e acido folico.

Da tempo, gli insetti entrano nella dieta di numerose popolazioni in Africa, Asia e Sud America, mentre nei paesi europei il consumo di insetti ha solo recentemente attratto l'interesse delle aziende alimentari e dei consumatori. Gli insetti possono essere consumati

interi freschi o sottoposti a trattamenti termici o ridotti in forma di farine successivamente utilizzabili in numerose preparazioni dove gli insetti non risultano più “riconoscibili”.

I principali gruppi di insetti di interesse per il consumo umano includono coleotteri, bruchi, cavallette, locuste, grilli e cicale; questi posseggono valori nutrizionali paragonabili a quelli delle carni più comunemente consumate (Roncolini, et al., 2018; Kourimska e Adamkova, 2016).

Come già accennato nei paragrafi precedenti, l’interesse verso gli insetti edibili è sorto dalla necessità di trovare alternative per rispondere alla crescente domanda di carne, legata alla continua crescita demografica della popolazione umana mondiale.

Tra le specie di maggiore interesse ai fini dell’allevamento il grillo domestico (*Acheta domestica*), la tarma della farina (*Tenebrio molitor*) e la falena di cera (*Galleria mellonella*) (Kourimska e Adamkova, 2016).

### **1.6. Rischi associati al consumo di insetti**

Il consumo di insetti edibili può rappresentare una minaccia per la salute del consumatore, per la presenza di microrganismi patogeni e/o loro tossine e contaminanti (es. metalli pesanti) (Kourimska e Adamkova, 2016). Inoltre, mangiare insetti può causare allergie: infatti, alcuni insetti posseggono un esoscheletro rigido formato da chitina, un omopolisaccaride difficile da digerire per l’uomo, per la limitata espressione di chitinasi, un enzima in grado di rompere i legami glicosidici della chitina, la cui quantità è insufficiente alla completa metabolizzazione di questo composto.

I rischi microbiologici associati al consumo di insetti, individuati dall’EFSA, derivano principalmente dal microbiota intestinale, correlato alle condizioni di allevamento (substrati e mangimi) e dal microbiota introdotto con le operazioni di manipolazione, di lavorazione e di conservazione. Nel suo complesso, tale microbiota include prevalentemente batteri ascritti ai generi *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Lactobacillus*. L’EFSA ha recentemente riportato alcuni dati relativi alla carica di batteri mesofili aerobi totali, anaerobi ed Enterobacteriaceae in *T. molitor*, *Locusta migratoria* e *Zophobas atratus* allevati ai fini del consumo umano, nei quali sono state rilevate, per i gruppi microbici in elenco, conte vitali prossime a  $10^7$  unità formanti colonia per grammo.

Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che gli artropodi sono vettori di agenti patogeni zoonotici e, quindi, causa di infezioni e malattie trasmesse all’uomo e agli animali (Committee, 2015).

Al rischio microbiologico, legato alla presenza di specie microbiche patogene, micotossine e tossine batteriche, si aggiungono i rischi derivanti dalla presenza di contaminanti chimici, come pesticidi, tossine e metalli pesanti, e di allergeni, come la chitina (Roncolini, et al., 2018). Per i motivi sopra esposti è, quindi, consigliato consumare insetti che siano allevati in condizioni ben definite e controllate, assicurate anche da una scelta dei mangimi più adeguati e sicuri. Inoltre, è raccomandato il trattamento termico (es. cottura, pasteurizzazione, etc.) degli insetti destinati al consumo umano per ridurre eventuali rischi microbiologici. Infine, risulta cruciale individuare e valutare adeguatamente i rischi igienici e tossicologici relativi al consumo di insetti edibili, nonché studiarne la composizione e il valore nutrizionale, ai fini della loro ottimale integrazione nell'alimentazione umana (Kourimska e Adamkova, 2016). In Europa, dal 1° gennaio 2018, è entrato in vigore il Regolamento (UE) n. 2015/2283 che ridefinisce la procedura per la valutazione e la commercializzazione di nuovi alimenti, compresi gli insetti e le loro parti. Questo Regolamento ha anche semplificato le procedure di immissione sul mercato dell'UE di prodotti alimentari tradizionali dai paesi terzi (Roncolini, et al., 2018).

### **1.7. *Tenebrio molitor***

*Tenebrio molitor*, conosciuto comunemente come “tarma della farina”, è un coleottero della famiglia dei Tenebrionidi. Sebbene la larva sia onnivora, questa predilige prodotti a base di cereali, residui di cariossidi, crusca, resti di vegetali e carne, e frequenta ambienti secchi con temperature comprese tra 23 e 26°C.

Le larve di *T. molitor* rappresentano un alimento ricco di proteine e acidi grassi polinsaturi; queste sono, inoltre, fonte di amminoacidi essenziali. Nella Tabella 1.1 sono riportati i valori nutrizionali relativi a *T. molitor*. Dal punto di vista della sicurezza alimentare, poiché le larve di questi insetti sono utilizzate senza una preliminare eviscerazione, il microbiota intestinale delle larve viene a contatto, necessariamente, con il microbiota del tratto gastro-intestinale umano, rappresentando un potenziale rischio (Grau, et al., 2017).

Attraverso il substrato usato per l'allevamento è possibile condizionare la composizione del microbiota intestinale dell'insetto; studi recenti (Wynants, et al., 2019; Mancini, et al., 2019) dimostrano che se i mangimi sono deliberatamente contaminati con patogeni umani (es. *Salmonella*, *Listeria*), questi possono sopravvivere nell'intestino dell'insetto e, addirittura moltiplicarsi, costituendo un rischio serio per i potenziali consumatori. Ad esempio, è stata recentemente dimostrata la possibilità che substrati comunemente utilizzati come mangimi per l'allevamento di *Tenebrio*, come crusca di frumento, possano essere contaminati da

## Introduzione

*Salmonella* (Wynants, et al., 2019), e tale contaminazione possa avvenire direttamente in campo, sulle spighe.

Oltre al microbiota intestinale, sulla cuticola delle larve sono presenti microrganismi che derivano sostanzialmente dagli ambienti che queste frequentano per nutrirsi.

Date queste premesse, risulta chiaro l'interesse ad approfondire le conoscenze relative al microbiota associato agli insetti edibili, e a sperimentare soluzioni atte a mitigarne i rischi associati, tra cui la somministrazione di batteri probiotici durante l'allevamento (Grau, et al., 2017).

**Tabella 1.1: Valori nutrizionali di larve di *T. molitor* (Kourimska e Adamkova, 2016)**

<b>Fattore nutrizionale</b>	<b>Valore nutrizionale</b>
Energia	206 kcal/100 g
Proteine	44 % in sostanza secca
Grassi	36 % in sostanza secca
Fibre	18 % in sostanza secca

Scopo del lavoro

## **2. SCOPO DEL LAVORO**

## Scopo del lavoro

Gli insetti hanno un valore nutrizionale paragonabile alle più comuni fonti di proteine animali, come emerge chiaramente dalla letteratura scientifica. Inoltre, la composizione in acidi grassi e il contenuto in fibre ne fanno un alimento nutrizionalmente bilanciato. Questi, tuttavia, possono anche rappresentare un rischio per la salute del consumatore, soprattutto in relazione alla potenziale presenza di patogeni umani, quali *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

Il presente lavoro di Tesi si è posto l'obiettivo di verificare la sopravvivenza di probiotici umani nell'intestino di larve di *T. molitor* destinate al consumo umano, come prima fase di una sperimentazione più ampia finalizzata a verificare la possibilità di contrastare la moltiplicazione nell'intestino delle larve di patogeni, con un meccanismo simile a quello documentato nell'uomo, arricchendo al contempo il microbiota intestinale dell'insetto con microrganismi benefici per il consumatore.

Con la finalità sopra descritta, cellule vegetative di ceppi probiotici di *B. clausii*, preliminarmente isolati da preparati commerciali di Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi) sono state inoculate in campioni di farinaccio usati come substrato per l'allevamento di larve di *T. molitor*, con lo scopo di: i) studiarne la sopravvivenza in farinaccio; ii) studiarne la capacità di colonizzazione e l'eventuale persistenza nell'intestino di *T. molitor* durante 7 giorni di allevamento; iii) studiarne la vitalità e l'eventuale sporificazione nell'intestino delle larve, sia fresche sia liofilizzate, dopo 7 giorni di allevamento.

### **3. MATERIALI E METODI**



### 3.1. Mantenimento di larve di *T. molitor* in farinaccio inoculato con ceppi probiotici di *B. clausii*

#### 3.1.1. Reperimento e coltivazione di ceppi probiotici di *Bacillus clausii*

Nel presente lavoro di Tesi è stata utilizzata una sospensione di spore di ceppi probiotici di *B. clausii* contenuti nel prodotto farmaceutico Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi S.p.a. Origgio, Italia). In base a quanto dichiarato dal produttore, ogni flaconcino contiene  $2,0 \times 10^9$  spore in un volume totale di 5 mL, equivalenti a una carica di  $4,0 \times 10^8$  spore/mL.

Al fine di individuare il substrato di crescita più adatto per lo sviluppo di *B. clausii* sono stati preliminarmente valutati quattro differenti mezzi colturali: PCA (*Plate Count Agar*), MH (*Mueller-Hinton*) agar, LB (*Luria-Bertani*) agar e BHI (*Brain Heart Infusion*) agar. La composizione chimica dei terreni di coltura sopra elencati è riportata nelle Tabelle 3.1- 3.4.

**Tabella 3.1: Composizione del terreno di coltura PCA (*Plate Count Agar*)**

Componente	Quantità (g/L)
Estratto di lievito	2,5
Triptone (digerito pancreatico di caseina)	5
Destrosio	1
Agar	15

**Tabella 3.2: Composizione del terreno di coltura MH (*Mueller Hinton*) agar**

Componente	Quantità (g/L)
Estratto di carne	2,0
Idrolizzato di caseina	17,5
Amido	1,5
Agar	18

**Tabella 3.3: Composizione del terreno di coltura LB (*Luria-Bertani*) agar**

Componente	Quantità (g/L)
Estratto di lievito	5
Triptone	10
NaCl	10
Agar	18

**Tabella 3.4: Composizione del terreno di coltura BHI (Brain Heart Infusion) agar**

<b>Componente</b>	<b>Quantità (g/L)</b>
Infuso da cervello di vitello	12,5
Infuso di carne di bue	5
Peptone	10
Glucosio	5
Sodio cloruro	5
Sodio fosfato bibasico	2,5
Agar	18

La vitalità e la carica dei ceppi probiotici di *B. clausii* contenuti nei flaconcini di Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi) sono state determinate mediante conta vitale su piastra. Da un flacone (5 mL) di Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi) sono state preparate diluizioni seriali decimali in soluzione fisiologica (NaCl 0,85 % p/v); da ciascuna diluizione sono stati prelevati 100 µL e inoculati sui 4 terreni di coltura in studio, utilizzando il metodo di semina per spandimento; le piastre sono state, quindi, incubate a 30°C. Il terreno BHI è risultato il migliore evidenziando lo sviluppo di colonie di *B. clausii* già dopo 24 h di incubazione, mentre la comparsa di colonie sui terreni LB agar, MH agar e PCA è stata osservata solo dopo 36-48 h di incubazione. I risultati sono stati espressi come media delle Unità Formanti Colonie (UFC) per mL di campione.

### 3.1.2. Preparazione dell'inoculo

Un mL di una sospensione di spore di *B. clausii* prelevata da un flacone di Enterogermina 2 miliardi/ 5 mL (Sanofi) è stato inoculato in 20 mL di terreno BHI e incubato in agitazione (150 rpm) a 30 °C. Dopo 24 h di incubazione, la brodocoltura è stata centrifugata a 4'000 rpm (centrifuga ROTOFIX 32 A, Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Germania) per 10 min. A seguito della rimozione del surnatante, il *pellet* cellulare è stato risospeso in 20 mL di soluzione fisiologica sterile (0,85 % NaCl, p/v). La carica di *B. clausii* nella sospensione è stata determinata preliminarmente con lo spettrofotometro UV-1800 (Shimadzu Kyoto, Giappone) misurando la densità ottica nello spettro del visibile ( $\lambda=600$  nm), previa diluizione del campione con acqua per biologia molecolare sterile (1:1000). La carica batterica della sospensione è stata quindi determinata sulla base della seguente correlazione:

$$1 A_{600\text{nm}} : 5 \times 10^8 \text{ cellule/mL} = X A_{600\text{nm}} : Y \text{ cellule/mL}$$

## Materiali e metodi

dove 1 è il valore di assorbanza a cui corrisponde la concentrazione batterica di  $5,0 \times 10^8$  cellule/mL;  $X A_{600nm}$  è il valore di assorbanza della sospensione batterica diluita 1:1000 a cui corrisponde il valore di concentrazione batterica Y espressa in cellule/mL. La carica batterica è stata quindi ulteriormente verificata mediante enumerazione sui mezzi solidi BHI e MH.

### 3.1.3. Inoculo del farinaccio con *B. clausii*

Aliquote (2,4 mL) della sospensione di cellule vegetative di *B. clausii* contenente  $2,0 \times 10^{11}$  cellule/mL (preparata come descritto al paragrafo 3.1.2) sono state inoculate in 6 vaschette di alluminio (capacità: 2,25 L, dimensioni: 5 x 21 x 27 cm), ciascuna contenente 240 g di farinaccio, fornito dal Molino Agostini s.r.l. (Osimo, Italia), per raggiungere una concentrazione finale di  $2,0 \times 10^9$  cellule/g di farinaccio; l'inoculo è stato effettuato distribuendo in ciascuna vaschetta 120 sub-aliquote da 20  $\mu$ L della sospensione batterica, utilizzando una pipetta semiautomatica, e miscelando il farinaccio inoculato con un cucchiaino sterile per 5 minuti.

### 3.1.4. Allevamento di larve di *T. molitor* su farinaccio inoculato con *B. clausii*

In 3 delle 6 vaschette preparate, come descritto al paragrafo 3.1.3, sono stati aggiunti 100 g di larve di *T. molitor* acquistate presso un negozio di animali situato a Jesi (Ancona, Italia); le 6 vaschette con e senza larve (Figura 3.1) sono state, quindi, siglate con un codice alfanumerico di seguito illustrato.

WB1, WB2, WB3: farinaccio inoculato con una sospensione di *B. clausii*.

WMB1, WMB2, WMB3: farinaccio inoculato con una sospensione di *B. clausii* e aggiunto di larve di *T. molitor*.



a



b

**Figura 3.1:** Vaschette di alluminio contenenti farinaccio con: pannello a: cellule vegetative di ceppi probiotici di *B. clausii*; pannello b: cellule vegetative di ceppi di *B. clausii* e larve di *T. molitor*.

Successivamente, sono stati aggiunti 32 g di carote ogni 2 giorni, preliminarmente tagliate a fette (spessore ~5 mm) con un bisturi sterile, come fonte di acqua per gli insetti (Figura 3.2). Le vaschette sono state poste al buio in una camera a T ( $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidità relativa ( $60 \pm 5\%$ ) controllate.

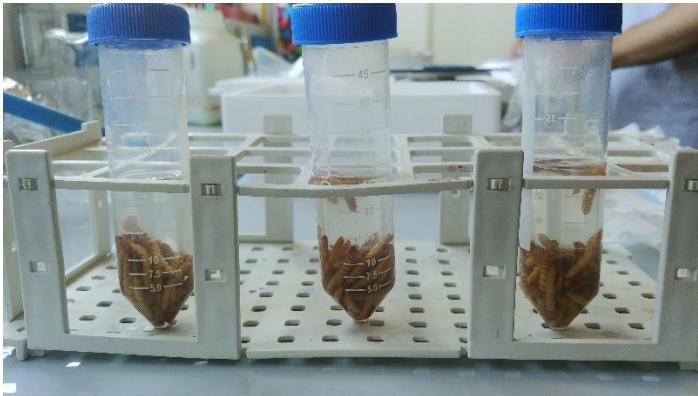


**Figura 3.2:** Substrato utilizzato per l'allevamento di larve di *T. molitor*, costituito da farinaccio e carote a fette

### 3.1.5. Campionamento

Dieci grammi di larve (M) e 10 grammi di farinaccio (W) sono stati campionati preliminarmente all'inserimento nelle vaschette e a intervalli regolari nel corso del periodo di allevamento, rispettivamente 1 (T1), 3 (T3) e 7 giorni (T7); 10 g di farinaccio sono stati, inoltre, campionati subito dopo l'inoculo con *B. clausii* (T0). Le larve, inserite in tubi sterili, sono state uccise trattando a -20 °C per 40 min. Ciascun campione di larve prelevate a T1, T3 e T7 è stato suddiviso in due aliquote, ciascuna da 5 g; la prima aliquota è stata analizzata tale quale, mentre la seconda aliquota è stata sottoposta a lavaggio con una soluzione acquosa di etanolo al 70 % (v/v), secondo il protocollo descritto da Wynants et al. (2019).

In dettaglio, 5 g di larve sono stati pesati all'interno di un flacone sterile da 50 mL e sono stati aggiunti di 30 mL di una soluzione acquosa di etanolo al 70% (v/v) (Figura 3.3). La sospensione è stata agitata per inversione manuale del flacone per circa 1 minuto. L'etanolo è stato rimosso e successivamente sono stati effettuati due ulteriori lavaggi con 30 mL di acqua deionizzata sterile per la rimozione dell'etanolo residuo.



**Figura 3.3: Lavaggio delle larve di *T. molitor* con una soluzione acquosa di etanolo al 70 % (v/v)**

I campioni sono stati siglati con un codice alfanumerico di seguito illustrato:

WMB1-MNW, WMB2-MNW, WMB3-MNW: larve di *T. molitor* prelevate da WMB1, WMB2 e WMB3 (farinaccio inoculato con la sospensione di *B. clausii*) non lavate;

WMB1-MW, WMB2-MW, WMB3-MW: larve di *T. molitor* prelevate da WMB1, WMB2 e WMB3 (farinaccio inoculato con la sospensione di *B. clausii*) lavate con una soluzione acquosa di etanolo al 70% (v/v);

WMB1-W, WMB2-W, WMB3-W: farinaccio prelevato da WMB1, WMB2 e WMB3 (farinaccio inoculato con una sospensione di *B. clausii* e aggiunto di larve di *T. molitor*).

Al termine del periodo di allevamento (7 gg), 10 g di larve sono state campionate dalle vaschette WMB1, WMB2 e WMB3, sottoposte a lavaggio come descritto precedentemente,

congelate a -20 °C all'interno di tubi sterili e liofilizzate utilizzando il liofilizzatore VirTis Wizard 2.0 (SP Scientific, Pennsylvania, Stati Uniti d'America). I campioni di larve liofilizzate sono stati siglati come ML1, ML2 e ML3.

Tutti i campioni sono stati analizzati per determinare la quantità di *B. clausii* mediante PCR quantitativa (qPCR).

### 3.2. Costruzione delle curve standard

#### 3.2.1. Estrazione di DNA batterico

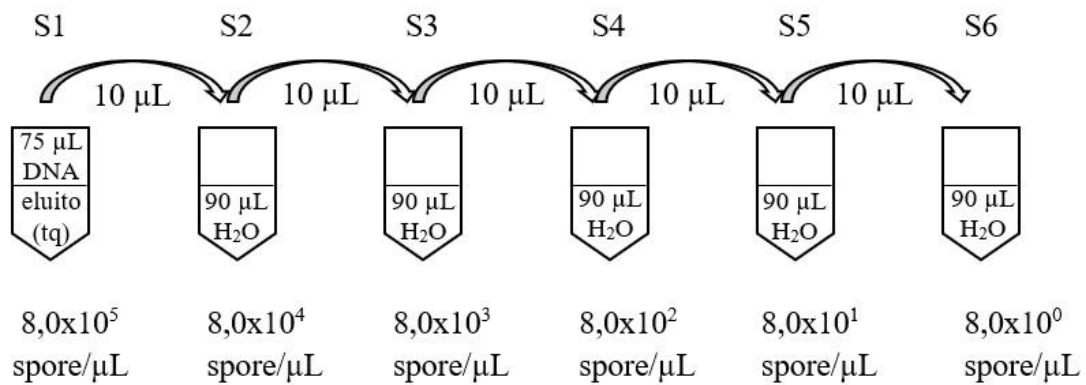
L'estrazione del DNA sia dalle cellule vegetative sia dalle spore di *B. clausii* è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (E.Z.N.A. soil DNA Kit; Omega Bio-tek, Norcross, GA, Stati Uniti d'America) secondo il protocollo del produttore. Per la costruzione delle curve standard il DNA è stato estratto da:

- 150 µL di Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi);
- 300 µL di una sospensione di cellule vegetative di *B. clausii* preparata inoculando per spandimento 100 µL della sospensione di spore contenute in Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi) sul terreno di coltura BHI agar incubato a 30°C per 48 h. Al termine del periodo di incubazione, sono state con un'ansa sterile alcune colonie, successivamente risospese in 10 mL di soluzione fisiologica sterile (0,85% NaCl p/v). La carica batterica della sospensione di cellule vegetative così ottenuta è stata determinata mediante conta vitale su piastra (in doppio) utilizzando lo stesso terreno di coltura;
- 250 mg di farinaccio\* inoculato con 1 mL delle diluizioni seriali decimali di spore di *B. clausii* a concentrazione nota (da  $4,0 \times 10^8$  spore/mL a  $4,0 \times 10^3$  spore/mL) ottenute per diluizione di Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi);
- 250 mg di farinaccio\* inoculato con 1 mL delle diluizioni seriali decimali di cellule vegetative di *B. clausii* a concentrazione nota (da  $2,0 \times 10^{11}$  cellule/mL a  $2,0 \times 10^6$  cellule/mL) ottenute per diluizione della sospensione di cellule vegetative di *B. clausii* contenente  $2,0 \times 10^{11}$  cellule/mL.

\*Il farinaccio destinato all'estrazione del DNA per la costruzione delle curve standard, precedentemente all'inoculo, è stato sterilizzato in autoclave a 120 °C per 15 min.

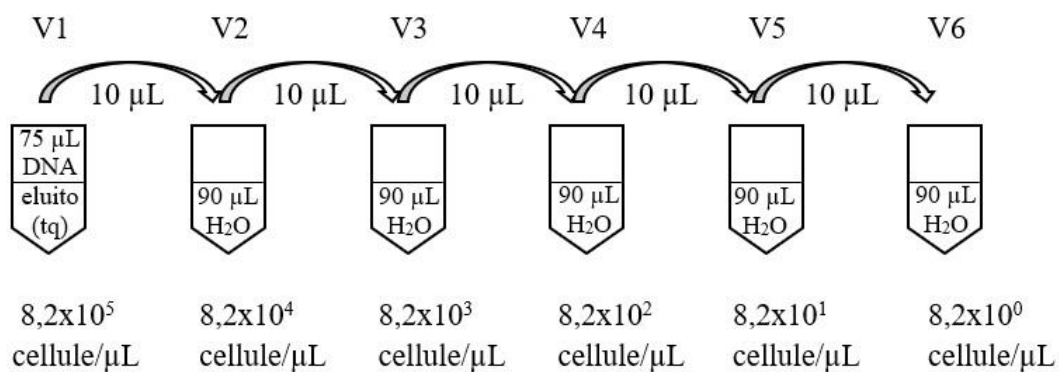
3.2.2. Preparazione delle sospensioni standard di DNA

Il DNA estratto da 150  $\mu\text{L}$  di Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi), (contenenti  $\sim 6,0 \times 10^7$  spore di *B. clausii*) è stato eluito in un volume di 75  $\mu\text{L}$  di acqua per biologia molecolare (1  $\mu\text{L}$  di tale estratto diluito contiene approssimativamente il DNA estratto da  $8,0 \times 10^5$  spore di *B. clausii*). Per costruire la curva standard, sono state preparate diluizioni seriali decimali utilizzando acqua deionizzata sterile per biologia molecolare, come descritto nella Figura 3.4.



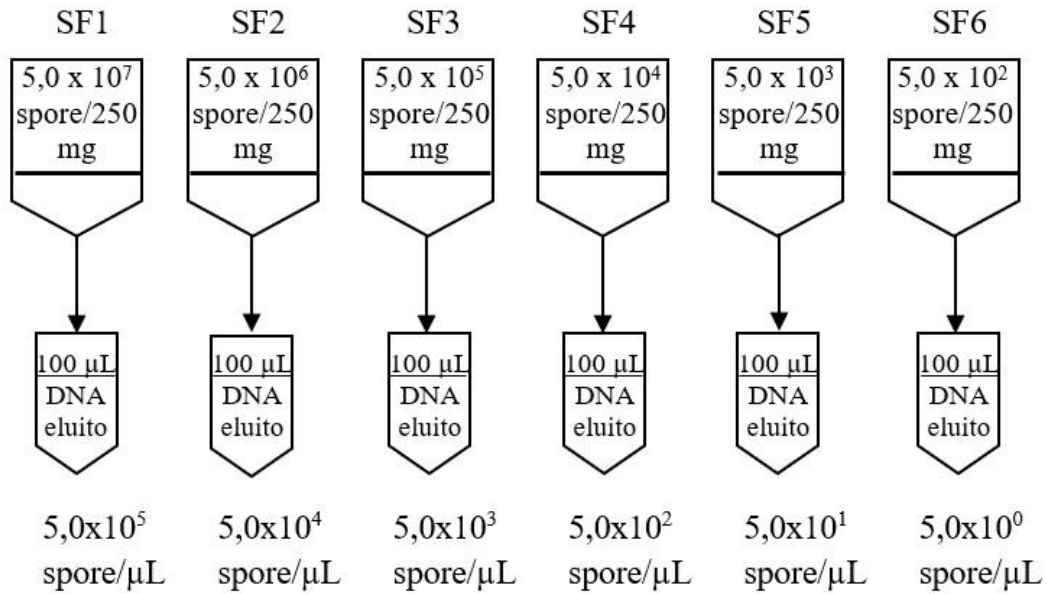
**Figura 3.4:** Diluizioni seriali decimali del DNA estratto dalle spore di *B. clausii* contenute in 150  $\mu\text{L}$  di Enterogermina 2 miliardi/ 5 mL (Sanofi)

Il DNA estratto da 300  $\mu\text{L}$  di sospensione cellulare (contenente  $\sim 6,2 \times 10^7$  cellule vegetative di *B. clausii*) è stato eluito in un volume totale di 75  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{L}$  di DNA estratto corrisponde a  $8,2 \times 10^5$  cellule/ $\mu\text{L}$ ). Per costruire la curva standard, sono state preparate diluizioni seriali decimali utilizzando acqua per biologia molecolare, come descritto nella Figura 3.5.



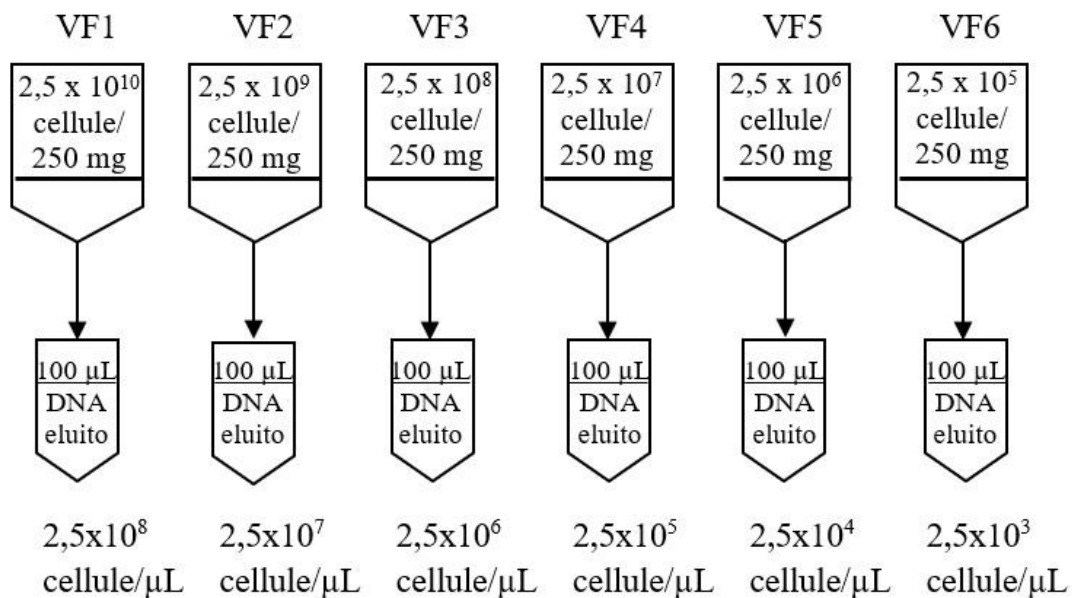
**Figura 3.5:** Diluizioni seriali decimali del DNA estratto dalle cellule vegetative di *B. clausii* contenute in 300  $\mu\text{L}$  di sospensione cellulare di *B. clausii*

Il DNA estratto prelevando 250 mg di farinaccio (contenente  $\sim 5,0 \times 10^7$  spore) è stato eluito in un volume totale di 100  $\mu$ L, come mostrato nella Figura 3.6 (1  $\mu$ L di DNA corrisponde a  $5,0 \times 10^5$  spore/ $\mu$ L).



**Figura 3.6:** Sospensioni di DNA estratto da farinaccio inoculato con spore di *B. clausii* per la costruzione delle curve standard

Il DNA estratto prelevando 250 mg di farinaccio (contenente  $\sim 2,5 \times 10^{10}$  cellule di *B. clausii*) è stato eluito in 100  $\mu$ L, come mostrato nella Figura 3.7 (1 $\mu$ L di DNA corrisponde a  $2,5 \times 10^8$  cellule/ $\mu$ L).



**Figura 3.7:** Sospensioni di DNA estratto da farinaccio inoculato con cellule vegetative di *B. clausii* per la costruzione delle curve standard.



### 3.2.3. PCR quantitativa (qPCR)

L'amplificazione degli estratti di DNA mediante qPCR è stata effettuata impiegando i primer specifici per il gene *erm34*, disegnati da Perotti et al. (2006); la sequenza di tali primer è riportata in Tabella 3.5. Il termociclatore Mastecycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germania) è stato utilizzato per l'amplificazione in un volume finale di 10 µL, contenente i reagenti elencati in Tabella 3.6.

**Tabella 3.5: I primer specifici utilizzati per l'amplificazione del gene *erm34*.**

Primer	Sequenza
fw	AAT TTT TAC CGC CCC TCA AG
rev	ACT TTT GGA ACA TGC CGA AC

**Tabella 3.6: Composizione della miscela di amplificazione del gene *erm34*.**

Mix	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale	V per singolo campione
qPCR Master Mix*			5 µL
Primer forward	10 µM	0,5 µM	0,5 µL
Primer reverse	10 µM	0,5 µM	0,5 µL
DNA estratto			4 µL

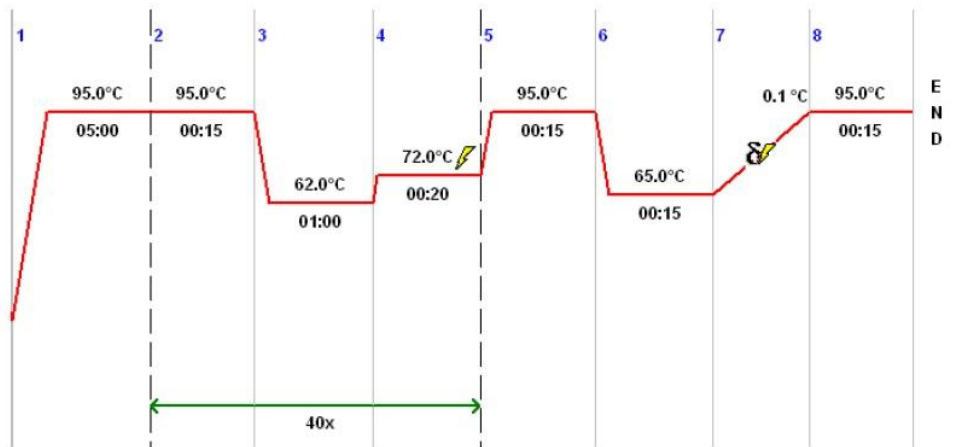
\*Type-it 2X HRM PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germania)

Quattro uL di ogni diluizione seriale decimale di DNA estratto dalle sospensioni di spore e cellule vegetative di *B. clausii* e dal farinaccio inoculato, preparate come descritto al paragrafo 3.2.2 (Figure 3.4-3.7), sono stati utilizzati per la costruzione delle curve standard necessarie ai fini della quantizzazione di spore e/o cellule vegetative di *B. clausii*. Per ogni curva standard, sono stati calcolati dal Mastecycler ep realplex software i seguenti parametri: efficienza di amplificazione (E) e coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) (Stolovitzky e Cecchi, 1996). L'efficienza di amplificazione è stata stimata sulla base della pendenza (*slope*) della curva standard, usando la formula  $E = 10^{(-1 / \text{slope})} - 1$ . Il limite di rilevazione del sistema di amplificazione è stato determinato attraverso la costruzione di curve standard nell'intervallo compreso tra  $\sim 10^0$  e  $10^7$  cellule vegetative di *B. clausii*, nel caso delle sospensioni cellulari, e tra  $\sim 10^0$  e  $10^5$  cellule vegetative e spore di *B. clausii*, nel caso del DNA estratto da farinaccio

## Materiali e metodi

inoculato. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando il ciclo termico illustrato in Figura 3.8. La specificità della reazione di amplificazione è stata verificata mediante la costruzione di curve di *melting*, prevedendo, al termine della reazione di amplificazione, un graduale aumento della temperatura da 60 a 95 °C (con una velocità di rampa pari a 0,1 °C/s) (Figura 3.8). Tutte le amplificazioni sono state eseguite in triplo.

### PCR Program



**Figura 3.8:** Il ciclo termico per la amplificazione del gene *erm34* di *B. clausii* via PCR quantitativa (qPCR)

### 3.3. Quantizzazione di *B. clausii* in farinaccio e larve via PCR quantitativa (qPCR)

I campioni di larve (lavate, non lavate e liofilizzate) e di farinaccio (prelevati e codificati come descritto paragrafo 3.1.5) sono stati diluiti in rapporto 1:10 con soluzione fisiologica sterile (0,85 % NaCl, p/v) e omogeneizzati con lo Stomacher 400 Circulator (VWR International PBI, Milano, Italia) trattando a 260 rpm per 5 min. Da ciascun omogenato è stato prelevato 1 mL, trasferito in provette per microcentrifuga da 1,5 mL e centrifugato per 10 minuti a 14'000 rpm (centrifuga ROTOFIX 32 A, Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Germania). I *pellet* cellulari ottenuti sono stati conservati a -20 °C, previa eliminazione del surnatante.

I *pellet* di biomassa microbica sono stati quindi sottoposti ad estrazione del DNA utilizzando il kit commerciale E.Z.N.A. soil DNA Kit (Omega Bio-tek) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il DNA estratto è stato eluito in 100 µL di acqua per biologia molecolare. Quattro µL di ogni estratto sono stati analizzati in triplo mediante PCR quantitativa (qPCR) applicando il protocollo descritto al paragrafo 3.2.3. La quantità assoluta di cellule vegetative di *B. clausii* per µL di DNA è stata calcolata automaticamente da Mastecycler ep realplex software basandosi sulla pendenza della curva standard preparata con le diluizioni seriali decimali del DNA estratto dalle cellule vegetative di *B. clausii*. Successivamente è stato calcolato il numero delle cellule di *B. clausii* per grammo di ogni campione. I risultati sono stati espressi come media delle tre repliche effettuate per ogni campione  $\pm$  deviazione standard.

### 3.4. Analisi semi-quantitativa per la determinazione della vitalità di *B. clausii* nelle larve di *T. molitor*

Per l'analisi della vitalità di *B. clausii* nelle larve di *T. molitor* sono stati preparati due *pool* di campioni:

- *pool* M, prelevando 3,33 g di larve dai campioni WMB1, WMB2 e WMB3 (tempo T7) per un totale di 10 g; le larve sono state successivamente lavate con soluzione acquosa di etanolo al 70% (v/v);
- *pool* ML, prelevando 3,33 g di larve liofilizzate (ML1+ML2+ML3) per un totale di 10 g.

I due *pool* di campioni sono stati diluiti con soluzione fisiologica sterile (0,85 NaCl, p/v) in rapporto 1:10 e omogeneizzati come precedentemente descritto al paragrafo 3.3. Per l'enumerazione delle spore batteriche, un'aliquota (1 mL) di ciascun omogenato è stata preliminarmente sottoposta a trattamento termico (80°C per 15 minuti) per la rimozione delle

## Materiali e metodi

cellule vegetative. Gli omogenati trattati e non trattati termicamente sono stati quindi sottoposti a diluizioni seriali decimali. Cento  $\mu\text{L}$  di ciascuna diluizione sono stati inoculati per spandimento su piastre contenenti BHI agar, incubate a  $30^\circ\text{C}$  per 48 h.

Al termine del periodo di incubazione, 2 mL di soluzione fisiologica sterile (NaCl 0,85%, p/v) sono stati aggiunti alle piastre che presentavano colonie; la biomassa cellulare è stata quindi prima distaccata dalla piastra con una ansa e successivamente prelevata con una pipetta Pasteur in condizioni di sterilità. Le sospensioni cellulari così ottenute sono state trasferite in provette da 1,5 mL e centrifugate a 14'000 rpm (ROTOFIX 32 A) per 10 min. Il DNA è stato estratto dai *pellet* ottenuti utilizzando un kit commerciale (E.Z.N.A. soil DNA Kit, Omega Bio-tek) e quindi amplificato via PCR secondo quanto descritto ai paragrafi 3.2.1 e 3.2.3. I risultati sono stati espressi come presenza (+) o assenza (-) di *B. clausii*.

### 3.5. Analisi statistica

L'analisi della varianza ad una via (ANOVA) è stata effettuata utilizzando il software JMP 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) al fine di: i) valutare la correlazione della carica di *B. clausii* nel farinaccio e nelle larve di *T. molitor* prelevate ad intervalli regolari nel corso del periodo di mantenimento (T0, T1, T3 e T7); ii) valutare l'effetto del lavaggio delle larve sulla carica totale di *B. clausii* nelle stesse larve; iii) valutare l'influenza della presenza delle larve sulla carica di *B. clausii* sul farinaccio durante il periodo di allevamento. Le differenze sono state considerate significative per valori di  $P < 0,05$ .

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### 4.1. Valutazione dei terreni di coltura

Al fine di individuare il substrato di crescita più adatto per lo sviluppo di *B. clausii* sono stati valutati 4 differenti mezzi colturali. Il miglior terreno dal punto di vista della velocità di crescita del microrganismo è risultato BHI agar evidenziando lo sviluppo delle colonie già dopo 24 h di incubazione. Al contrario, la comparsa delle colonie negli altri terreni è stata osservata solo dopo 36-48 h di incubazione.

I risultati delle conte vitali effettuate per verificare la vitalità e la carica dei ceppi probiotici di *B. clausii* contenuti in Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi) mostrano una carica equivalente a quella dichiarata in etichetta, ossia pari a  $4,0 \times 10^8$  spore/mL (Tabella 4.1) in tutti i terreni utilizzati.

**Tabella 4.1: Risultati delle conte vitali di *B. clausii* effettuate su quattro diversi terreni di coltura, espressi come il valore medio UFC/mL**

Terreno/diluizioni	UFC/mL
PCA	$4,0 \times 10^8$
MHB	$4,0 \times 10^8$
LB	$4,0 \times 10^8$
BHI	$4,0 \times 10^8$

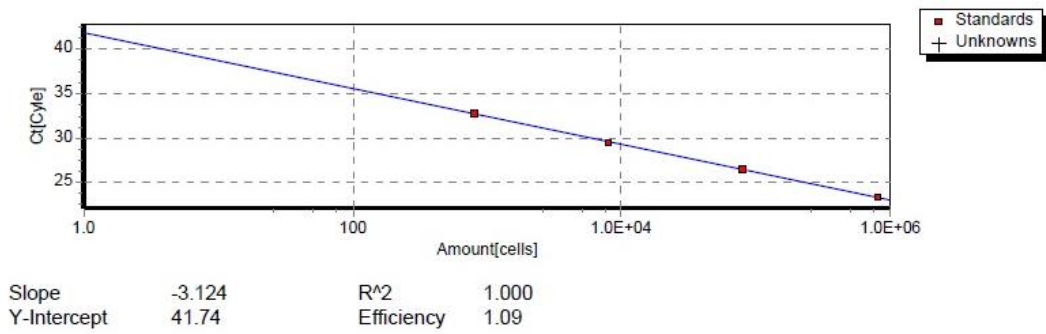
PCA (*Plate Count Agar*), MH (*Mueller-Hinton*) agar, LB (*Luria-Bertani*) agar e BHI (*Brain Heart Infusion*) agar

#### 4.2. Curve standard

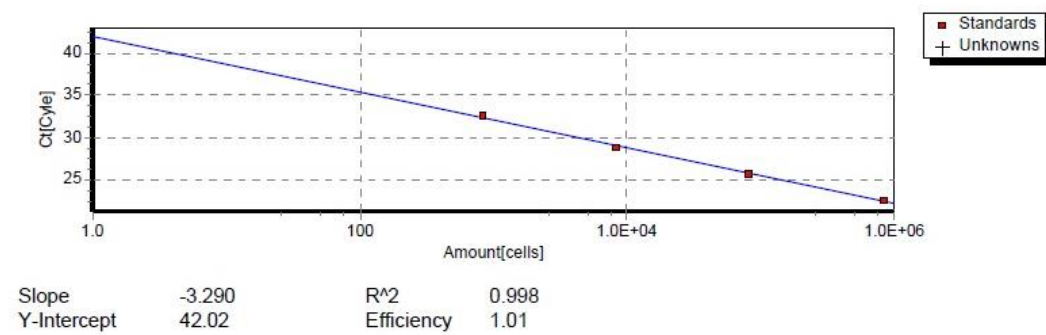
Per verificare l'efficienza della qPCR e del kit utilizzato per l'estrazione del DNA sia dalle cellule vegetative sia dalle spore di *B. clausii* sono state costruite 2 curve standard, una con DNA estratto dalle sospensioni di spore e un'altra con DNA estratto dalle sospensioni di cellule vegetative. Per controllare l'efficienza del kit usato per l'estrazione del DNA nelle condizioni sperimentali, sono state costruite 2 ulteriori curve standard con DNA estratto da farinaccio sterile inoculato o con spore o con cellule vegetative di *B. clausii*. Per ogni curva standard è stata calcolata l'efficienza (E),  $R^2$ , e la sensibilità analitica, data dalla concentrazione minima dell'analita che lo strumento può rivelare nelle condizioni applicate. In Figura 4.1 sono riportate le curve standard costruite.

# Risultati e discussione

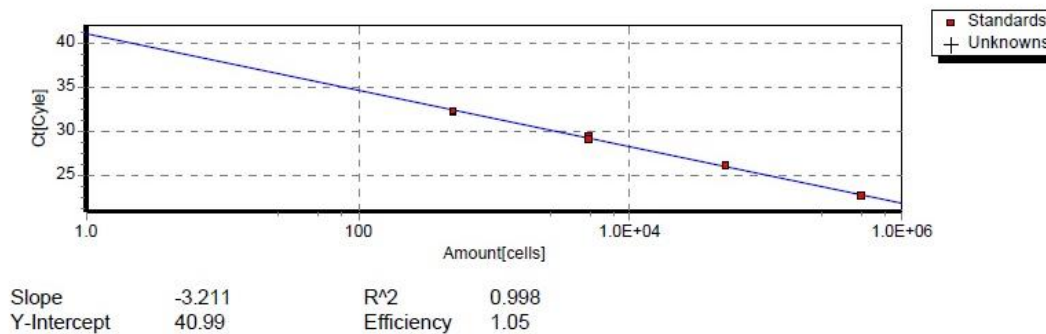
**a**



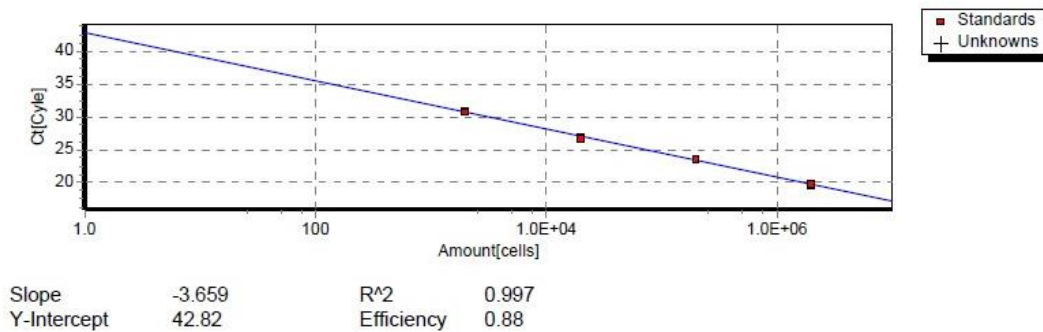
**b**



**c**



d



**Figura 4.1:** Curva standard costruita con il a) DNA estratto dalle spore di *B. clausii* contenute in *Enterogermina 2 miliardi/5 mL (Sanofi)*; b) DNA estratto dalle cellule vegetative di *B. clausii*; c) DNA estratto da farinaccio sterile inoculato con spore di *B. clausii*; d) DNA estratto da farinaccio sterile inoculato con cellule vegetative di *B. clausii*

Come riportato nella Figura 4.1, le curve standard per la qPCR costruite con il DNA estratto dalle sospensioni di cellule vegetative e spore di *B. clausii*, così come quella costruita con il DNA estratto da farinaccio sterile inoculato con le spore, mostrano un'alta efficienza di amplificazione con valori compresi tra 1,05 e 1,09. Al contrario, la curva standard costruita con il DNA estratto da farinaccio sterile inoculato con cellule vegetative di *B. clausii* mostra un valore di efficienza leggermente più basso (0,88) di quello considerato accettabile da Nolan et al. (2013) e compreso tra 0,90 e 1,10. I valori di  $R^2$  per tutte le curve standard sono buoni, in quanto compresi tra 0,997 e 1,000.

La sensibilità analitica del protocollo di amplificazione è risultata uguale in tutte le curve standard ottenute, pari a  $10^2$  cellule o spore/ $\mu$ L; questo risultato è in linea con quanto riportato da Perotti et al. (2006) circa l'utilizzo della stessa coppia di primer specifici per il gene *erm34* e le stesse condizioni di amplificazione testate nel presente lavoro di Tesi.

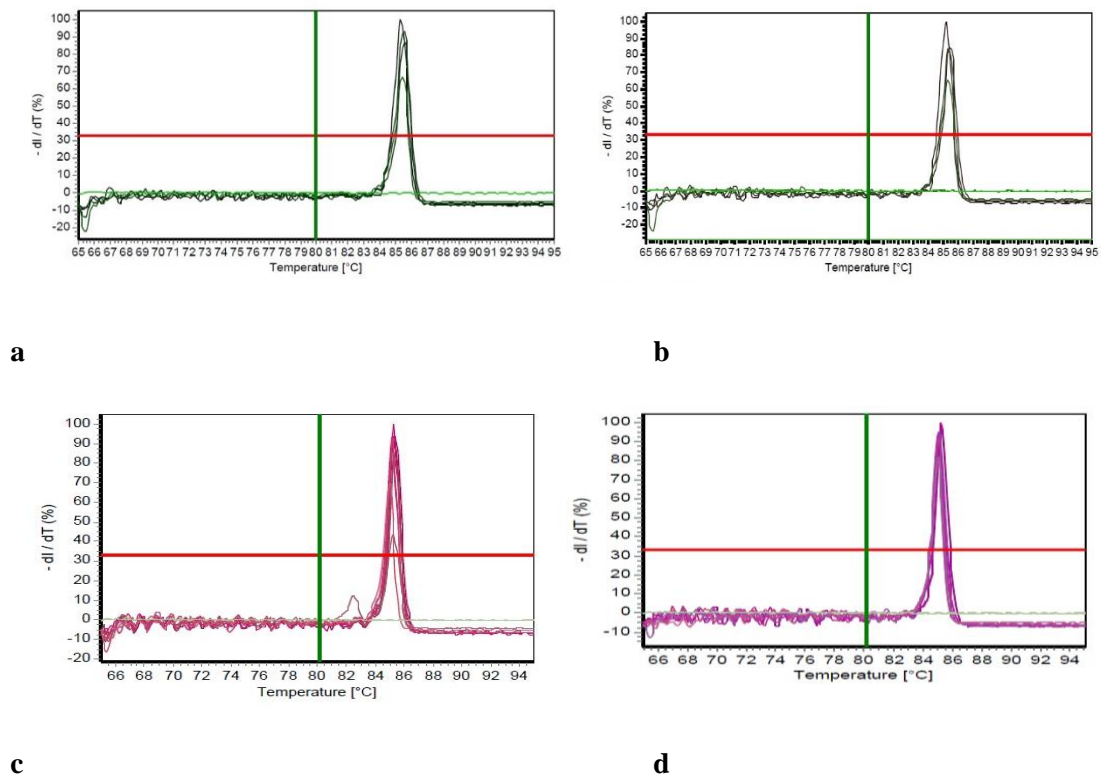
In particolare, *erm34* è un gene cromosomico e presente in singola copia nel genoma di *B. clausii*. Esso codifica per una metilasi ribosomiale, denominata adenina-nmetiltransferasi; la metilazione catalizzata da questo enzima conferisce resistenza ai macrolidi, lincosamidi e streptogramina B. L'elevato livello di resistenza conferito dal gene *erm34* a questo microorganismo probiotico gli consente di rimanere vitale nell'intestino umano quando viene somministrato in concomitanza a macrolidi orali (Bozdogan, et al., 2004; Perotti, et al., 2006).

I risultati complessivamente ottenuti mostrano una buona efficienza del kit utilizzato per l'estrazione del DNA (EZNA Soil DNA Extraction kit) sia dalle spore sia dalle cellule



vegetative di *B. clausii* nelle condizioni sperimentali applicate, confermando i risultati precedentemente ottenuti da Dineen et al. (2010) relativamente all'efficienza di questo kit di rimuovere eventuali inibitori della PCR dagli estratti.

I profili delle curve di *melting* degli ampliconi ottenuti mediante qPCR confermano l'elevata specificità dei primer impiegati per l'amplificazione del gene *erm34*, con temperature di *melting* comprese in un *range* particolarmente ristretto, ossia 85,0 e 85,6 °C, come mostrato nelle Figure 4.2.



**Figura 4.2:** Curve di *melting* ottenute dagli ampliconi del DNA estratto da a) spore di *B. clausii* contenute in *Enterogermina* 2 miliardi/5 mL (Sanofi); b) cellule vegetative di *B. clausii*; c) spore di *B. clausii* contenute nel farinaccio sterile inoculato; d) cellule vegetative di *B. clausii* contenute nel farinaccio sterile inoculato.

#### 4.3. Determinazione della quantità di *B. clausii* nelle larve di *T. molitor* e nel farinaccio

La carica di *B. clausii* nella sospensione preparata per inoculare il farinaccio, determinata attraverso la misurazione della densità ottica nello spettro del visibile ( $\lambda=600$  nm) è risultata pari a 11,3 Log UFC/mL.

I risultati delle conte vitali effettuate in doppio confermano i dati ottenuti dall'analisi spettrofotometrica (Tabella 4.2).

**Tabella 4.2: Risultati della conta vitale di *B. clausii* su BHI agar e MH agar**

Terreno	Log UFC/mL $\pm$ deviazione standard
BHI agar	11,37 $\pm$ 0,01
MH agar	11,41 $\pm$ 0,01

BHI (*Brain Heart Infusion*) agar; MH (*Mueller-Hinton*) agar.

In Tabella 4.3 sono riportati i risultati della quantizzazione assoluta delle cellule di *B. clausii* ottenuti dall'analisi qPCR del DNA estratto dai campioni di farinaccio e dalle larve prelevate a intervalli regolari nel corso del periodo di monitoraggio: T0, T1, T3 e T7.

**Tabella 4.3: Risultati dell'analisi qPCR espressi come media delle tre repliche analitiche in Log cellule/g  $\pm$  deviazione standard**

Campioni	T0	T1	T3	T7
<b>WB1</b>	9,45 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,67 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	9,54 $\pm$ 0,03 <sup>ab</sup>	9,39 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>
<b>WB2</b>	9,71 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	9,59 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	9,37 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	9,45 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>
<b>WB3</b>	9,46 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	8,87 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	9,56 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	9,68 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
<b>WMB1-W</b>	9,76 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	8,98 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	8,52 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	8,19 $\pm$ 0,07 <sup>d</sup>
<b>WMB2-W</b>	9,74 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	9,07 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	8,79 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	8,05 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>
<b>WMB3-W</b>	9,82 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	8,99 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	8,64 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>	8,03 $\pm$ 0,12 <sup>d</sup>
<b>WMB1-MNW</b>		6,95 $\pm$ 0,03 <sup>aA</sup>	5,58 $\pm$ 0,14 <sup>bA</sup>	6,51 $\pm$ 0,07 <sup>cA</sup>
<b>WMB2-MNW</b>		6,87 $\pm$ 0,02 <sup>aA</sup>	5,85 $\pm$ 0,07 <sup>bA</sup>	6,05 $\pm$ 0,05 <sup>cA</sup>
<b>WMB3-MNW</b>		7,20 $\pm$ 0,07 <sup>aA</sup>	5,54 $\pm$ 0,14 <sup>bA</sup>	6,30 $\pm$ 0,01 <sup>cA</sup>
<b>WMB1-MW</b>		6,91 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	5,29 $\pm$ 0,32 <sup>bA</sup>	5,80 $\pm$ 0,21 <sup>bB</sup>
<b>WMB2-MW</b>		6,33 $\pm$ 0,08 <sup>aA</sup>	5,35 $\pm$ 0,06 <sup>bB</sup>	6,11 $\pm$ 0,12 <sup>aA</sup>
<b>WMB3-MW</b>		6,22 $\pm$ 0,08 <sup>aB</sup>	5,41 $\pm$ 0,13 <sup>bA</sup>	5,93 $\pm$ 0,19 <sup>aA</sup>

Diverse lettere minuscole in apice indicano differenze statisticamente significative nel tempo. Diverse lettere maiuscole in apice indicano differenze statisticamente significative tra larve lavate e non lavate, per ogni replica e ogni tempo. Le differenze sono considerate significative per valori di  $P < 0,05$ .

Legenda:

W  $\rightarrow$  farinaccio

M  $\rightarrow$  *Tenebrio molitor*

WB(n)  $\rightarrow$  farinaccio + *Bacillus clausii*

WMB-W(n)  $\rightarrow$  farinaccio + *B. clausii* (prelevato dalle vaschette che contengono le larve)

WMB-MNW(n)  $\rightarrow$  *T. molitor* non lavato

WMB-MW(n)  $\rightarrow$  *T. molitor* lavato in una sospensione acquosa di etanolo al 70% (v/v)

dove (n) indica il numero della vaschetta da cui i campioni sono stati prelevati.

T0  $\rightarrow$  giorno 0

T1  $\rightarrow$  giorno 1

T3  $\rightarrow$  giorno 3

T7  $\rightarrow$  giorno 7

Nei campioni di larve (M) e farinaccio (W) prelevati preliminarmente all'introduzione delle larve nelle vaschette, l'analisi qPCR mostra una carica di *B. clausii* al di sotto del limite di rivelazione, suggerendo l'assenza del microrganismo sia nel substrato utilizzato per l'allevamento, sia nell'intestino dell'insetto.

Come atteso, successivamente all'inoculo del farinaccio, la carica di *B. clausii* si attesta intorno a ~ 9,66 Log cellule/g.

È interessante notare come a seguito dell'inoculo, nelle vaschette di controllo prive di larve di *T. molitor*, la carica di *B. clausii* rimane pressoché invariata mentre quella delle vaschette contenenti larve (WMB-W) decresce in modo significativo nel tempo in ogni replica, passando da 9,82 a 8,03 Log cellule/g. In un precedente studio condotto da Mancini et al. (2019) sulla contaminazione di *Listeria monocytogenes* del substrato di allevamento di larve di *T. molitor*, gli autori chiaramente affermano che la presenza delle larve contribuisce a mantenere costante la carica del microrganismo in studio, rilievo questo dovuto probabilmente ai processi naturali di digestione e di espulsione delle feci dell'insetto.

Un diverso quadro emerge dai risultati riportati da Wynants et al., (2019) relativi alla carica di *Salmonella* spp. nella crusca inoculata con il patogeno, in presenza di larve di *T. molitor*; in questo ulteriore studio, infatti, gli autori descrivono una significativa riduzione della carica dello specifico patogeno durante l'intervallo di allevamento considerato. Questi risultati evidenziano una diversa risposta delle diverse specie batteriche sia ai substrati utilizzati per l'allevamento sia alla presenza di larve e, conseguentemente, una diversa persistenza di tali specie nell'intestino dell'insetto.

Infine, nei campioni di farinaccio prelevati dalle vasche di controllo nel corso del periodo di prova (WB) si osservano leggere fluttuazioni della carica di *B. clausii*, comprese tra 8,87 e 9,71 Log cellule/g.

In analogia a quanto riportato nella presente Tesi, anche nell'esperimento condotto da Wynants et al., (2019) *Salmonella* spp. persiste nel substrato in assenza di larve senza variazioni significative nel tempo, viceversa Mancini et al., (2019) riportano una progressiva riduzione di *L. monocytogenes* in un ulteriore substrato.

Dai dati relativi ai saggi di qPCR emerge anche una rapida capacità di colonizzazione dell'intestino di *T. molitor* da parte delle cellule vegetative di *B. clausii* inoculate nel farinaccio, con una carica già piuttosto elevata, e pari a ~ 6-7 Log cellule/g dopo sole 24 h (T1) di allevamento. Tale carica pare mantenersi stabile nel tempo, fatta eccezione per una lieve ma statisticamente significativa riduzione al tempo T3, dove questa raggiunge ~ 5 Log cellule/g. I risultati ottenuti sulle larve lavate e non lavate mostrano come la fase di lavaggio

con la soluzione acquosa di etanolo non riduca in modo significativo la carica di *B. clausii*, in analogia a quanto dimostrato anche nello studio di Mancini et al.,(2019), dato questo che suggerisce una localizzazione prettamente intestinale di *B. clausii* rilevato mediante qPCR.

**Tabella 4.4: Analisi statistica sui risultati medi delle tre repliche analitiche e biologiche espressi in Log cellule/g  $\pm$  deviazione standard**

Campioni	T0	T1	T3	T7
<b>WB</b>	9,54 $\pm$ 0,12 <sup>B</sup>	9,38 $\pm$ 0,036 <sup>A</sup>	9,49 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	9,51 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>
<b>WMB-W</b>	9,77 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	9,01 $\pm$ 0,04 <sup>B</sup>	8,65 $\pm$ 0,11 <sup>B</sup>	8,09 $\pm$ 0,07 <sup>B</sup>

Dalla Tabella 4.4 emerge chiaramente come la presenza di larve nel farinaccio influenzi in modo significativo la carica di *B. clausii*, la quale in tali vaschette risulta più bassa - per tutti i tempi e tutte le repliche – rispetto alla carica osservata nelle vaschette di controllo, contenenti farinaccio inoculato privo di larve.

**Tabella 4.5: Risultati dell'analisi qPCR dei campioni di larve liofilizzate espressi come media del triplo tecnico in Log cellule/g  $\pm$  deviazione standard**

Campioni	Log cellule/g $\pm$ deviazione standard
<b>ML1</b>	6,10 $\pm$ 0,17
<b>ML2</b>	6,63 $\pm$ 0,04
<b>ML3</b>	6,32 $\pm$ 0,17

ML1, ML2, ML3: larve liofilizzate prelevate rispettivamente da WMB1, WMB2, WMB3.

Come mostrato in Tabella 4.5, il processo di liofilizzazione delle larve non ha influenzato negativamente la carica di *B. clausii*, nonostante precedenti autori (Caparros Megido, et al., 2017) abbiano affermato che tale processo possa ridurre la carica microbica totale di *T. molitor* e *Acheta domesticus*.

Il dato ottenuto nella presente Tesi e relativo al processo di liofilizzazione delle larve è, viceversa, in accordo con quanto affermato da altri autori (Caparros Megido et al., 2017; Grabowsky e Klein, 2017) circa la capacità di questo trattamento di inattivare piuttosto che uccidere i microrganismi. La carica di cellule vegetative e di spore mediante PCR semi-quantitativa dei bulk di colonie raccolte dalle piastre seminate con diluizioni seriali decimali dell'omogenato ottenuto dalle larve liofilizzate e non liofilizzate affermano il contrario (Tabella 4.6), con cariche di 6 Log cellule/g e 2 Log spore/g di *B. clausii* nelle larve non liofilizzate al tempo T7 e cariche di 5 Log cellule/g e 1 Log spore/g nelle larve liofilizzate.

**Tabella 4.6: Risultati della determinazione della vitalità ed eventuale sporificazione di *B. clausii* in larve di *T. molitor*.**

Diluizioni (piastre)		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
M	cellule vegetative	+	+	+	+	+	+	-
	spore	+	+	-	-	-	-	-
ML	cellule vegetative	+	+	+	+	+	-	-
	spore	+	-	-	-	-	-	-

M, larve fresche; ML, larve liofilizzate. I simboli + e – identificano la presenza/assenza di *B. clausii* nelle piastre sulla base dei risultati dell'analisi PCR.

## 5. CONCLUSIONI

Dalle sperimentazioni condotte nell'ambito della presente Tesi sperimentale sono emerse interessanti osservazioni relative alla persistenza di *B. clausii* nel farinaccio, nelle larve lavate, non lavate e in quelle liofilizzate.

In primo luogo, nelle vaschette contenenti le larve, è stato osservato un decremento graduale della carica di *B. clausii* nel corso del tempo di monitoraggio (7 gg); viceversa, nelle vaschette che non contenevano larve (controllo), la carica è rimasta pressoché invariata nel tempo.

Per quanto riguarda la colonizzazione dell'intestino delle larve da parte di cellule vegetative di *B. clausii*, già al tempo T1 è stato rilevato un significativo aumento della carica di questo microrganismo, passato da non rilevato (T0) a ~ 6 Log cellule/g (T1); nessuna variazione significativa è stata, al contrario, osservata nei successivi tempi di monitoraggio, dato questo che potrebbe suggerire fenomeni di autolimitazione (es. *quorum sensing*). Nessuna significativa riduzione è stata, inoltre, osservata a seguito del processo di liofilizzazione, a conferma della notevole resistenza di questo microrganismo sporigeno allo specifico trattamento testato, particolarmente utilizzato in campo alimentare. Infine, nessuna significativa differenza è stata osservata nelle conte di cellule vegetative o spore di *B. clausii* in larve lavate e non lavate, a dimostrazione di una localizzazione del microrganismo testato a livello intestinale, dove questo persiste in forma vegetativa, mantenendo la capacità di sporificare. Sviluppi futuri della presente Ricerca potranno riguardare *challenge test* con larve di *T. molitor* e patogeni umani (es. *Listeria* spp. *Salmonella* spp.), inoculati congiuntamente a spore di ceppi probiotici di *B. clausii* atti a verificare la capacità di questo microrganismo di contrastare la moltiplicazione di agenti di infezione nell'uomo.

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuto e guidato durante il mio percorso di studi triennale permettendomi di raggiungere questo traguardo.

Innanzitutto, ringrazio la Dott.ssa Lucia Acquilanti che mi ha sostenuto e aiutato durante la stesura della presente tesi dimostrando grande professionalità; la Dott.ssa Vesna Milanovic per la sua disponibilità e collaborazione nello svolgimento delle analisi di laboratorio e di elaborazione dei dati ottenuti; il Dott. Andrea Osimani per il suo contributo fornito al progetto provvedendo all'analisi statistica dei risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio.

Ringrazio poi i miei genitori che sono stati di fondamentale importanza nel raggiungimento di questo traguardo, dimostrando sostegno morale ma soprattutto molta pazienza nei momenti più critici.



Bibliografia

## **BIBLIOGRAFIA**

1. **Cutting, S. M., 2011.** Bacillus Probiotics. Food Microbiology, Volume 28, pp. 214-220.
2. **Lakshmi, S. G., Jayanthi, N., Saravanan, M. e Sudha Ratna, M., 2017.** Safety assesment of *Bacillus clausii* UBBC07, a spore forming probiotic. Toxicology Reports, Volume 4, pp. 62-71.
3. **Urdaci, M. C., Bressollier, P. e Pinchuk, I., 2004.** *Bacillus clausii* Probiotic Strains: Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. Journal of Clinical Gastroeneterology, Volume 38, pp. 86-90.
4. **Bozdogan, B., Galopin, S. e Leclercq, R., 2004.** Characterization of a new erm-related macrolide resistance gene present in probiotic strains of *Bacillus clausii*. Applied and enviromental microbiology, 7(1), pp. 280-284.
5. **Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., Simon, R., Pèlerin, F., Justen, P. e Urdaci, M. C., 2017.** Safety assessment of *Bacillus subtilis* CUI for use as a probiotic in humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volume 83, pp. 54-65.
6. **Roncolini, A., Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanovic, V., Sabbatini, R. e Clementi, F., 2018.** Il potenziale degli insetti edibili: aspetti microbiologici. Industrie alimentari, luglio-agosto. Volume 57.
7. **Kourimska, L. e Adamkova, A., 2016.** Nutritional and sensory quality of edible insect. NFS Journal, Volume 4, pp. 22-26.
8. **EFSA Scientific Committee, 2015.** Scientific Opinion on a risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. EFSA Journal 2015;13(10):4257, 60 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4257
9. **Grau, T., Vilcinskas, A. e Joop, G., 2017.** Sustainable farmin of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. De gruyter, Volume 72, pp. 337-349.
10. **Wynants, E., Frooninckx, L., Van Miert, S., Geeraerd, A., Claes, J. e Van Campenhout, L., 2019.** Risks related to the presence of *Salmonella* sp. during rearing of mealworms (*Tenebrio molitor*) for food or feed: survival in the substrate and transmission to the larvae. Food Control, Volume 100, pp. 227-234.
11. **Mancini, S., Paci, G., Ciardelli, V., Turchi, B., Pedonese, F. e Fratini, F., 2019.** *Listeria monocytogenes* contamination of *Tenebrio molitor* larvae rearing substrate: Preliminaty evaluations. Food Microbiology, Volume 83, pp. 104-108.
12. **Perotti, M., Mancini, N., Cavallero, A., Carletti, S., Canducci, F., Burioni, R. e Clementi, M., 2006.** Quantitation of *Bacillus clausii* in biological samples by real-time polymerase chain reaction. Journal of Microbiological Methods, Volume 65, pp. 632-636.
13. **Dineen, S. M., Aranda IV, R., Anders, D. L. e Robertson, J. M., 2010.** An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. Journal of Applied Microbiology, Volume 109, pp. 1886-1896.
14. **Nolan, T., Huggett, J. e Sanchez, E., 2013.** Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR). National Measurements System.
15. **Caparros Megido, R., Desmedt, S., Blecker, C., Bèra, F., Haubruge, E., Alabi, T. e Francis, F., 2017.** Microbiological load of edible insects found in Belgium, Insects
16. **Grabowsky, N.T. e Klein, G., 2017.** Microbiology of cooked and dried edible Mediterranean field crickets (*Gryllus bimaculatus*) and superworms (*Zophobas atratus*) submitted to four different heating treatments. Food Science and Technology International.
17. **Stolovitzky, G. e Cecchi, G., 1996.** Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume 93, pp. 12947-12952.

Sitografia

## **SITOGRAFIA**

1. **Food and Agriculture Organization of the United Nation e World Health Organization, 2001.** Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation.  
<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
2. **Ministero della salute, 2018.** Linee guida su probiotici e prebiotici.  
[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1016\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf)
3. **Gemmellaro, S., 2019.** *Bacillus clausii*.  
<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/bacillus-clausii/>
4. **Dadax, 2019.** Worldometers  
<https://www.worldometers.info/it/>
5. **QIAGEN, 2019.** QIAGEN.  
<https://www.qiagen.com/sg/products/discovery-and-translational-research/detection/ish-and-northern-blotting/snp-detection/type-it-hrm-pcr-kit/#productdetails>