



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**RICERCA DI BDELLOVIBRIO E ORGANISMI SIMILI (BALOs) IN
CAMPIONI DI ACQUA DI MARE**

**RESEARCH OF BDELLOVIBRIO AND LIKE ORGANISMS (BALOs)
IN SEAWATER SAMPLES**

Tesi di Laurea di:
Michele Maria De Michele

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Francesca Biavasco

Correlatori:
Dott.ssa Elena Rocchegiani
Dott.ssa Donatella Ottaviani

Anno accademico 2020/2021

INDICE

Prefazione.....	4
CAPITOLO 1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 Bdellovibrio bacteriovorus and like organisms.....	8
1.2 Ciclo Biologico.....	12
1.3 Possibili impieghi dei BALOs.....	16
1.4 Halobacteriovorax.....	18
CAPITOLO 2. SCOPO DEL LAVORO.....	24
CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI.....	26
3.1 Ricerca di BALOs da campioni di acqua di mare.....	26
3.2 Scelta dei ceppi preda.....	27
3.3 Preparazione dei ceppi preda.....	36
3.4 Terreni di coltura.....	37
3.5 Arricchimento BALOs.....	44
3.6 Plaque Assay per arricchimento.....	46
3.7 Plaque Assay da acqua di mare.....	49
3.8 Plaque Assay da acqua ambientale.....	53

3.9 Biofotometro.....	55
3.10 PCR.....	57
3.11 Corsa elettroforetica.....	61
3.12 Saggio specificità di Halobacteriovorax.....	65
CAPITOLO 4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	67
CONCLUSIONI.....	75
RINGRAZIAMENTI.....	77
BIBLIOGRAFIA.....	79

PREFAZIONE

La prima osservazione dei batteri avvenne nel 1676 quando l'olandese Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) scoprì la presenza di “*animalcules*” nell'acqua attraverso l'impiego del microscopio ottico. L'acqua di mare è l'ambiente in cui sono presenti e sono stati isolati i batteri, non patogeni per l'uomo, oggetto di questo elaborato: i *Bdellovibrio and like organisms*. I *Bdellovibrio and like organisms* meglio conosciuti con l'acronimo di BALOs risultano possedere una spiccata attività predatoria nei confronti di diversi batteri Gram-negativi e patogeni tipici dei molluschi bivalvi: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella spp*, etc. Il consumo di molluschi bivalvi crudi o non adeguatamente cotti, proprio per la possibile presenza di microrganismi patogeni, infatti, può causare gastroenteriti e infezioni intestinali con un importante rischio per il consumatore (Ottaviani et al., 2014). Dato che i molluschi sono organismi in grado di filtrare e di nutrirsi di ciò che è presente nell'acqua, è possibile che accumulino al loro interno batteri pericolosi per la salute umana. Per far fronte a tale rischio, si è pensato di adottare alcune misure che siano in grado di ridurre la eventuale contaminazione microbiologica dei molluschi bivalvi, come, per esempio, fare in modo che vengano depurati o trasferiti in una zona completamente priva di contaminanti prima della commercializzazione (Lee et al., 2008). Tuttavia, le

diverse tecniche di purificazione quali *l'individual quick freezing* (surgelazione individuale e rapida), *l'heat-cool pasteurization* (pastorizzazione a caldo) e *l'high hydrostatic pressure* (alta pressione idrostatica), non vengono considerate del tutto soddisfacenti per garantire la salubrità dei molluschi e, in particolare, le ostriche non riescono a sopravvivere a questi trattamenti (Li et al., 2011). Perciò si è pensato ad un superamento di questi meccanismi di decontaminazione in maniera tale da garantire un'effettiva purificazione del sistema, per consentire il consumo del prodotto crudo e senza rischi. Una tecnologia innovativa è l'approccio biologico che utilizza l'attività antibatterica dei BALOs nell'acqua di mare (Ottaviani et al., 2014).

In Italia pochi gruppi di ricercatori stanno lavorando in questo settore e tra questi in particolare l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche sotto la guida della Dott.ssa Ottaviani (Ottaviani et al. 2018). Una prima ricerca svolta dai ricercatori IZSUM mirava a studiare l'abbondanza e la diversità dei ceppi di *Halobacteriovorax* specifici di *Vibrio* isolati dall'acqua di mare del Mare Adriatico. Inoltre permetteva di capire l'efficienza predatoria di *Halobacteriovorax* nei confronti dei ceppi *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae non-O1/O139*. Il ceppo preda utilizzato è stato *V. parahaemolyticus NCTC 10885*. Un altro studio, sempre condotto dalla Dott.ssa Ottaviani e colleghi, ha valutato l'applicazione di un *Halobacteriovorax* isolato dall'acqua del Mare

Adriatico nel controllo di *V. parahaemolyticus* nei mitili (*Mytilus galloprovincialis*). Sono stati condotti due esperimenti di decontaminazione di cozze da 72 h con *V. parahaemolyticus*. Nel primo esperimento sono state utilizzate cozze contaminate sperimentalmente con *Halobacteriovorax*, mentre nel secondo esperimento hanno utilizzato cozze che ospitano naturalmente *Halobacteriovorax* e sono state contaminate con 10⁵ UFC/ml di *V. parahaemolyticus*. Per enumerare *Halobacteriovorax* e *V. parahaemolyticus* hanno utilizzato tecniche di placcatura in agar a doppio strato (Richards et al., 2012). La PCR è stata effettuata per andare ad analizzare la porzione di rRNA 16S per identificare *Halobacteriovorax* (Davidov et al., 2006; Richards et al., 2013). Per entrambi gli esperimenti nel microcosmo test la concentrazione della preda è rimasta allo stesso livello di quella aggiunta sperimentalmente, ovvero 5 log per l'intero periodo di analisi. Nell'esperimento 1, i conteggi di *V. parahaemolyticus* nelle cozze erano significativamente più bassi nel microcosmo del test rispetto al controllo con una differenza massima di 2,2 log a 24 ore. I risultati dimostrano che *Halobacteriovorax* può modulare il livello di *V. parahaemolyticus* nelle cozze. Ovviamente l'impatto di *V. parahaemolyticus* sui bivalvi è rilevante e gli attuali processi di decontaminazione non sono sempre efficaci.

Da questi esperimenti si è dimostrato che *Halobacteriovorax* è un candidato adatto nello sviluppo di un approccio biologico alla purificazione di *V. parahaemolyticus* nei mitili (Ottaviani et. al., 2018).

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

1.1 BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS AND LIKE ORGANISMS

Al genere *Bdellovibrio*, [dal greco *βδέλλα*: sanguisuga], inserito per tassonomia nella famiglia delle *Bdellovibrionaceae*, appartengono batteri di piccole dimensioni (Brindani et al., 1998) che vennero casualmente scoperti nel 1962, quando gli scienziati Stolp e Petzoid stavano cercando di isolare e identificare alcuni batteriofagi di batteri delle piante (Stolp e Starr, 1963). Fanno parte dei *Bdellovibrio and like organisms* i generi *Bacteriovorax*, rinominato recentemente *Halobacteriovorax*, *Bdellovibrio*, *Bacteriolyticum* e *Peredibacter* (Koval et al., 2015). Tra loro è possibile riscontrare una caratteristica importante che è emersa osservando gli isolati di BALOs, ossia il luogo in cui è possibile riscontrarne la presenza di ognuno dimostrando la predilezione del genere *Bdellovibrio*, *Bacteriolyticum* e *Peredibacter* per le acque dolci e suoli mentre il genere *Halobacteriovorax* è stato quasi esclusivamente isolato in acqua salata (Li et al., 2015). Tutti questi microrganismi, Gram-negativi, aerobi, sono a forma di bastoncino, piccolo e ricurvo, hanno dimensioni di circa $0,2-0,5 \times 0,5-1,4 \mu\text{m}$ (Brindani et al., 1998) e sono dotati di un flagello polare (Fig.1) che permette loro di muoversi velocemente, raggiungendo una velocità compresa tra i 300 ed i 2000 μm al secondo, in modo tale che possano dirigersi verso la preda per poi attaccarla.

La struttura morfologica dei batteri Gram-negativi è composta da (a partire dall'esterno): una membrana esterna, la parete cellulare, lo spazio periplasmatico, la membrana citoplasmatica, il citoplasma ed il nucleo. La membrana cellulare ha la peculiare funzione di proteggere la cellula batterica dall'attacco di composti idrofobici dannosi; è formata da fosfolipidi e da uno strato di molecole complesse note come lipopolisaccaride batterico (LPS). Tuttavia la presenza di porine, canali speciali, permettono, attraverso il trasporto passivo, la permeabilità di sostanze nutritive quali: zuccheri, ioni minerali e aminoacidi per la cellula (La Placa, 2014). La parete cellulare, formata da un doppio strato lipidico collocato più esternamente allo strato di peptidoglicano (Antonelli et al., 2012), è responsabile della forma della cellula batterica, ed è in grado di proteggere la cellula sia dal punto di vista chimico che osmotico (Carlone e Pompei, 2014). Tuttavia non è in grado di contrastare la permeabilità di molecole idrofobiche, dannose per la cellula batterica; per questo è deputata la membrana esterna sopra descritta che perciò svolge un ruolo importante. Lo spazio periplasmatico si trova tra la parete cellulare e la membrana citoplasmatica ed è un compartimento intermedio e definito, il quale è ricco sia di proteine di trasporto che di enzimi degradativi (Tortora et al., 2008). L'ultimo strato cellulare è quello della membrana citoplasmatica, che appare con struttura trilaminare, formata da un doppio strato di fosfolipidi,

attraversati da proteine, pochi lipidi ed acidi grassi saturi (Antonelli et al., 2012). La membrana citoplasmatica è sede di processi biosintetici (per esempio sintesi di peptidoglicano) e regola gli scambi metabolici tra il citoplasma e l'ambiente esterno tramite diffusione passiva, per gradiente di concentrazione, o per trasporto attivo tramite proteine trasportatrici che permettono la permeazione di tutte le sostanze nutritive (La Placa, 2014). Il citoplasma batterico è sede sia dei ribosomi i quali, formati da RNA (60%) e proteine (40%) sono costituiti da due subunità asimmetriche, sono responsabili della sintesi proteica, e del nucleo formato da una singola molecola di DNA (La Placa, 2014). Il flagello si divide in tre parti: il filamento, costituito da flagellina (subunità proteica) che si dispone a formare un'elica, l'uncino, che lega il filamento al corpo basale, ed il corpo basale che è ancorato alla membrana citoplasmatica (Carlone e Pompei, 2014). Il corpo basale è formato da proteine che formano la parte longitudinale e da quattro anelli associati ad un asse centrale: l'anello L, più esterno e legato al lipopolisaccaride, l'anello P, legato al peptidoglicano della membrana esterna, e gli anelli S e M sono connessi alla membrana citoplasmatica (La Placa, 2014). Dato che i BALOs sono batteri monotrichi (possiedono un solo flagello) la cellula si sposterà in avanti per il movimento antiorario del flagello così che possa raggiungere la cellula preda; l'energia che provoca il movimento del flagello è generata dal corpo basale,

considerato il motore della cellula, e si ritiene che sia generata, per il trasporto di elettroni, dal potenziale di membrana (Antonelli et al., 2012). Appena la preda è stata riconosciuta e il parassita vi si è attaccato, prima di penetrare al suo interno perderà il flagello (Brindani et al., 1998); la progenie batterica sarà poi dotata di filamento flagellare, dato che questo ha un ruolo fondamentale nel raggiungimento di altre cellule preda, così che il ciclo possa ripetersi.

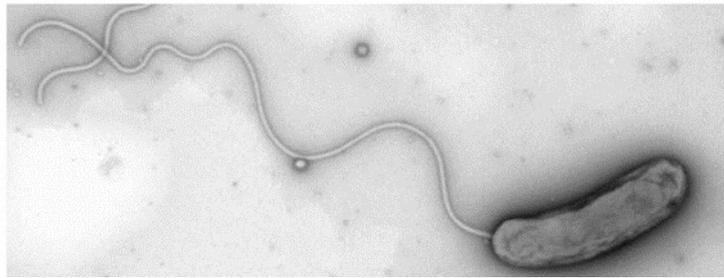
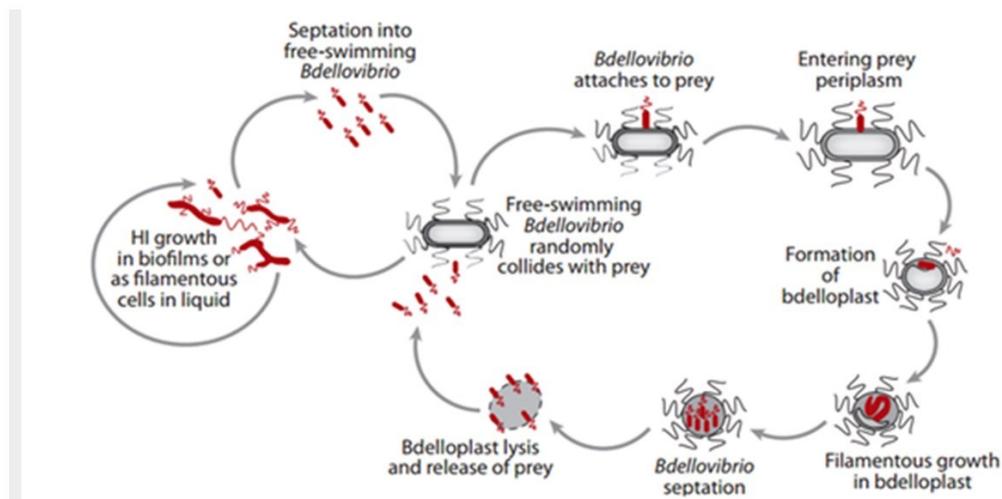


Figura 1. Immagine di *Bdellovibrio* al microscopio elettronico; evidente la presenza di un singolo flagello (Morehouse et al., 2010).

1.2 CICLO BIOLOGICO

I BALOs sono batteri selettivi riguardo la preda in quanto riescono ad attaccare esclusivamente microrganismi Gram-negativi. Il loro metabolismo aerobio obbligato permette di produrre energia dall'ossidazione di amminoacidi e acetato (Brindani et al., 1998). A differenza di altri batteri patogeni, presentano interessanti capacità biochimiche, producendo una quantità maggiore di ATP e crescendo molto più velocemente (Brock et al., 2005). Il ciclo vitale consiste in due fasi: la prima di vita libera, durante la quale i BALOs vanno alla ricerca della preda e per questo si muovono in acqua ad una velocità di circa 2000 lunghezze cellulari al minuto, e la seconda fase di attacco, meglio conosciuta come fase parassitaria endocellulare (Núñez et al., 2003), durante la quale i BALOs penetrano nella cellula ospite, si nutrono e si moltiplicano dando vita alle cellule figlie. Si ritiene che l'attacco della cellula preda non sia un evento casuale, ma che i BALOs, essendo predatori selettivi, riescano a distinguere i Gram-negativi dai Gram-positivi. Una volta entrati in contatto con la parete della cellula preda iniziano a muoversi ruotando sul proprio asse e formano dei pori per liberazione di enzimi idrolitici (Stolp, 1968); questo passaggio avviene molto velocemente in 1-2 minuti. La zona di contatto tra il predatore e la preda ha un diametro di circa 200 nm e il poro prodotto sulla membrana consentirà l'ingresso del predatore nel periplasma della preda (Sockett, 2009). È stato

dimostrato da alcuni studi, che la fase in cui il predatore si attacca alla membrana esterna della preda, può essere influenzata negativamente da alcuni fattori che ne impediscono la penetrazione: la presenza di inibitori metabolici come NaN_3 , la temperatura di incubazione non compresa fra i $30\text{-}35^\circ\text{C}$, la composizione e il pH del mezzo che non rientrano nel range ottimale e la condizione di anaerobiosi (Varon and Shilo, 1967). Quindi questa prima fase è reversibile e facilmente influenzabile, mentre una volta avvenuto l'attacco del predatore alla preda, l'evento è irreversibile.



I BALOs provocano cambiamenti significativi nella struttura della cellula preda, perché sono in grado di modificarne la membrana esterna senza distruggerla, utilizzando diversi enzimi, inclusi glicanasi, deacetilasi, peptidasi e lipopolisaccaridasi (Dietrich, 1998). In uno studio condotto da Starr e Baigent è stato dimostrato come il predatore, una volta attaccatosi alle cellule preda (per

esempio *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas phaseolicolae* e *Pseudomonas tabaci*), a seguito della formazione di pori, provochi la perdita di mureina (particolare tipo di peptidoglicano) con successiva disorganizzazione interna della cellula ospite (Starr et Baigent, 1966). Il *Bdellovibrio*, come tutti i membri del genere, modifica la membrana citoplasmatica della preda, abolendo il trasporto degli elettroni, e facendo in modo che gli enzimi degradativi e il materiale cellulare degradato possano essere trasferiti dal citoplasma della preda in quello del predatore (Núñez et al., 2003). Il processo di invasione da parte del *Bdellovibrio* nei confronti della cellula preda dura 2-3 ore. Una volta all'interno della cellula il *Bdellovibrio* è in grado di bloccare le fasi di biosintesi; inoltre riesce a impiegare gli acidi grassi ed i nucleotidi, della preda, per i suoi processi biosintetici, per esempio incorporando le catene degli acidi grassi, formerà dei lipidi che avranno una composizione simile a quelli della preda (Jackson et al., 1992; Varon et al., 1968). In seguito all'introduzione nello spazio periplasmico, il parassita assume la forma di un lungo filamento, delle forme oblunghe o più piccole (Núñez et al., 2003) dal quale, per scissione binaria, si genereranno 10-12 cellule figlie di piccole dimensioni, che nel loro insieme conferiranno alla cellula preda una forma sferica, detta bdelloplasto (Brock, 1994; Flannagan et al., 2004). Nel periplasma il *Bdellovibrio*, per avere più spazio per la sua crescita, riesce a modificare ulteriormente lo strato di

peptidoglicano della parete cellulare batterica, della preda, così da renderla più flessibile (Sokkett, 2009). Alcuni studi hanno dimostrato, con supporto di immagini al microscopio a forza atomica (AFM), come il complesso bdelloblasto-Bdellovibrio sia caratterizzato da una struttura superficiale liscia e presenti una forma rotonda o irregolare, cosa che invece non è riscontrabile in una cellula non parassitata, che si distingue per una struttura di superficie ruvida e per una forma oblunga. In questo ciclo biologico, che è definito preda-dipendente (ossia il predatore ha bisogno di parassitare una preda per sopravvivere, crescere e formare cellule figlie), il bdelloplasto, terminate le risorse necessarie per consentire la crescita e l'ospitalità del predatore, subirà una lisi con conseguente rilascio della progenie del *Bdellovibrio*, le quali andranno alla ricerca di altre cellule di Gram-negativi da parassitare, ripetendo il ciclo descritto.

1.3 POSSIBILI IMPIEGHI DEI BALOs

I BALOs, oltre a essere impiegati come possibili purificatori dei molluschi bivalvi, possono essere utilizzati per altre attività come la sanificazione degli alimenti, come agenti antibatterici sia a livello medico, che ambientale, industriale, sia nell'agricoltura. Nell'industria alimentare la conservazione del prodotto finito deve essere sempre garantita per fornire al consumatore un prodotto sicuro e che mantenga le caratteristiche organolettiche nel tempo. Diverse possono essere le tecniche applicabili per rendere possibile la conservazione dell'alimento: l'impiego di confezioni che modifichino i livelli di ossigeno e anidride carbonica, il sistema di refrigerazione (per i prodotti congelati la catena del freddo non deve essere mai interrotta), il trattamento del prodotto alimentare con acidi organici (Diedrich, 1988), la disidratazione, il confezionamento in atmosfera modificata o controllata, etc. Una nuova tecnica per migliorare la conservabilità del prodotto alimentare è rappresentata dall'impiego dei BALOs. Questi ultimi hanno dimostrato la capacità di ridurre i livelli di *E.coli* dopo 7 ore di incubazione a 30°C ad un pH non inferiore ai 6.8 (Jackson and Whiting, 1992). Un altro possibile ambito di impiego dei BALOs può essere quello medico, per il trattamento di infezioni periodontali dovute a periodontopatogeni (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*,

Fusobacterium nucleatum) (Harini et al., 2013). L'applicazione di *Bdellovibrio* in agricoltura ha dimostrato la capacità del *Bdellovibrio bacteriovorus* (Bd-17), naturalmente presente nella rizosfera (parte del suolo che circonda le radici delle piante, da cui vengono assorbiti tutti i nutrienti necessari e l'acqua) delle radici di soia, di inibire lo sviluppo di malattie batteriche, nella pianta, dovute a *Pseudomonas glycinea* (Scherff, 1973).

Si pensa anche ad un possibile impiego dei BALOs negli allevamenti; si è infatti scoperto che *B. bacteriovorus* HD100, somministrato per via orale, presentava attività parassitaria nei confronti di un ceppo di *Salmonella*, presente nell'intestino dei polli. I polli trattati non presentavano alcun effetto collaterale, in seguito alla somministrazione del *B. bacteriovorus*, anzi si è notato un miglioramento delle loro condizioni di salute con un'importante riduzione dell'infiammazione cecale causata dall'infezione da salmonella (Atterbury et al., 2011). Saranno necessari ulteriori studi sull'impiego dei BALOs per poter giungere alla sanificazione del prodotto alimentare e al loro utilizzo in terapia sia negli animali che nell'uomo. Ad oggi tuttavia uno studio condotto dal gruppo IZSUM ha dimostrato la capacità di *Bdellovibrio bacteriovorus* di abbattere significativamente la carica di *E.coli* su matrici carnee (Ottaviani et al., 2019).

1.4 HALOBACTERIOVORAX

Alla famiglia *Halobacteriovoraceae*, classe delle *Deltaproteobacteria*, appartengono i batteri del genere *Halobacteriovorax*, parassiti intracellulari, dotati di un flagello polare, con una elevata motilità (Koval et al., 2014 vedi articolo Richards 2015). Questi vibroni, lunghi circa 0.6 -1,0 μm , sono predatori selettivi in quanto riescono a parassitare batteri del genere *Vibrio* e altri batteri d'acqua salata, (estuari, acqua marina e laghi salati), ma non specie d'acqua dolce (Koval et al., 2015). I microrganismi, appartenenti al genere *Halobacteriovorax*, possono essere presenti, inoltre, nel suolo e nelle acque reflue (Fry et al., 1976). Il loro ciclo biologico è caratterizzato da fase di crescita e fase di attacco.

Halobacteriovorax attacca la preda penetrando attraverso la parete cellulare e si localizza nel periplasma e si replica dando origine alle cellule figlie che poi, una volta lisa la cellula ospite, vengono rilasciate nell'ambiente (Williams et al., 2015). In un certo senso *Halobacteriovorax* si comporta come un virus, dato che entrambi sono parassiti endocellulari e traggono energia dalla cellula parassitata, ma vi è una sostanziale differenza. Alcuni studi condotti sulle acque marine e sulle acque dei sedimenti hanno dimostrato come, in seguito alla lisi della cellula parassitata da virus, tutto il materiale cellulare, comprendente anche le sostanze nutritive, venga rilasciato all'esterno, così che possa essere

utilizzato come sostentamento anche da altri batteri o parassiti (Weitz et al., 2015). Questo non accade per la cellula che è stata parassitata da *Halobacteriovorax* perché questi traggono tutto il nutrimento per la propria crescita dalla cellula parassitata, quindi, una volta che questa sarà lisata, il contenuto cellulare rilasciato sarà molto scarso. (Starr e Baigent, 1966). Negli ultimi anni *Halobacteriovorax* ha suscitato molto interesse, date le sue importanti prestazioni per quanto riguarda la specificità nel riconoscere e attaccare le cellule preda e permettere quindi un processo di purificazione dell'acqua e dei molluschi bivalvi da eventuali patogeni. I ceppi di *Halobacteriovorax* hanno dimostrato una elevata specificità verso *V. parahaemolyticus*, ma esistono anche ceppi di *Halobacteriovorax* che sono predatori di *E. coli O157:H7* (figura 2) e di *S. typhimurium DT104*, che sono stati isolati da foce di fiume (Richards et al., 2015).

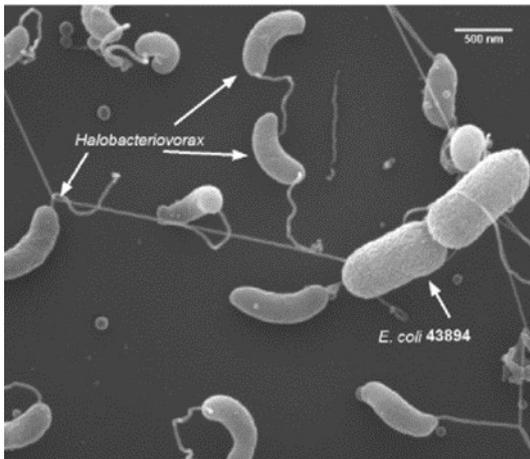


Figura 2– Immagine in microscopia elettronica a scansione di *Halobacteriovorax* ed *E. coli* in cui si notano le differenti dimensioni dei due batteri.

Per valutare la specificità di *Halobacteriovorax*, in acqua di mare, nei confronti di una preda e la sua capacità di parassitarla, si allestisce in laboratorio un saggio di placca (Fig. 3). Il saggio di placca prevede che vengano utilizzati ceppi di riferimento noti del predatore, in questo caso *Halobacteriovorax*, e la preda. L'allestimento di questo saggio consiste di porre in una piastra Petri uno strato di agar Pp20, sul quale verrà riversato il contenuto di un tubo da centrifuga che consiste in: 1 ml della coltura della preda isolata, 7.5 ml di acqua di mare e 7.5 ml di agar Pp20. La piastra incubata a 26°C ed osservata giornalmente, qualora l'attività predatoria di *Halobacteriovorax* fosse specifica per la preda impiegata, dovrebbe dimostrare entro i 7 giorni le placche di lisi. Proprio le placche di lisi dimostrano che il predatore è in grado di parassitare la preda, di nutrirsi del proprio contenuto citoplasmatico, e di farle raggiungere

conseguentemente la morte. La formazione delle placche, e quindi la capacità predatoria di *Halobacteriovorax*, risulta essere influenzata dal grado di salinità dell'acqua di mare impiegata. Nello studio condotto da Richards e collaboratori (Richards et al., 2015) si è voluta testare, attraverso un saggio di placca, la capacità predatoria di *Halobacteriovorax*, nei confronti di *E.coli O157:H7*, impiegando acqua di mare a diverse salinità. Si è dimostrato come nel saggio di placca, in cui si è utilizzata acqua di mare con bassa salinità (5 –10 ppt), siano evidenti placche di lisi anche di 1 cm di diametro. Mentre nel saggio di placca nel quale è stata utilizzata acqua ad elevata salinità (20-30 ppt), le placche di lisi dimostravano un diametro molto inferiore ad 1 cm. Di conseguenza una bassa salinità suggerisce una crescita ottimale del predatore, una elevata salinità non è in grado di garantire una spiccata attività predatoria di *Halobacteriovorax*.

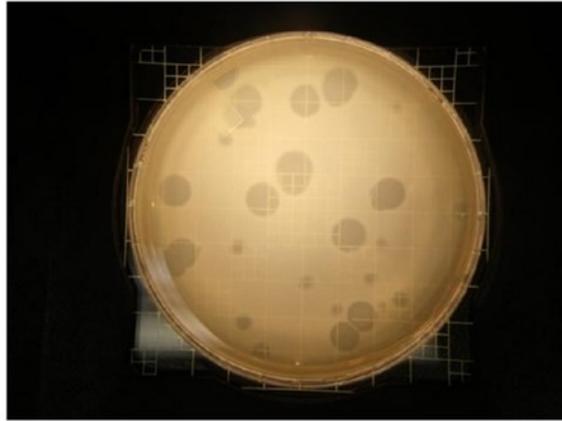


Figura 3- Saggio delle placche su agar Pp20: isolati di *Bacteriovorax* su terreno con delle cellule-preda di *V. parahaemolyticus* dopo incubazione per 7 giorni. (Richards et al., 2013).

Altri studi condotti da Williams e collaboratori (Williams et al., 2016. A), hanno dimostrato come la concentrazione di *Halobacteriovorax* aggiunto ad un microcosmo formato da acqua di estuario, contenente *Vibrio parahaemolyticus*, sia aumentata di oltre quattro ordini di grandezza, da 10^5 a $10^{9,3}$ ml⁻¹, raggiungendo un picco massimo tra le 48 e le 72 ore. La crescita esponenziale dei livelli di *Halobacteriovorax* è dovuta alla presenza della preda che gli conferisce il nutrimento necessario. Il *Vibrio parahaemolyticus* inoltre non è in grado di sopravvivere nel microcosmo per un periodo prolungato. Per questo dopo le 72 ore, per diminuzione della concentrazione di *Vibrio parahaemolyticus*, anche i livelli di *Halobacteriovorax* caleranno drasticamente (Fig.4).

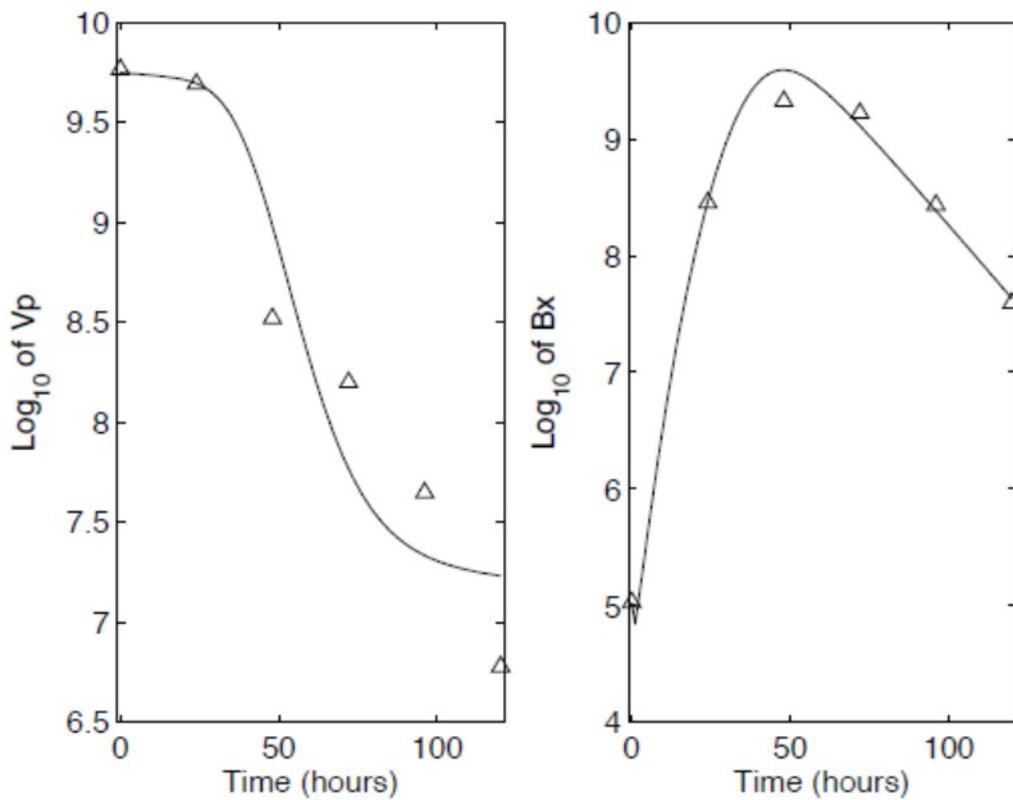


Figura 4 – A sinistra è dimostrata, tramite il log₁₀, la diminuzione dei livelli di *Vibrio parahaemolyticus* dopo 50 ore di incubazione nel microcosmo creato con acqua di mare e predatore. A destra è evidente come la concentrazione di *Halobacteriovorax* diminuisca drasticamente tra le 50 e le 72 ore di incubazione nel microcosmo (Williams et., 2016. B).

CAPITOLO 2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi sperimentale è stato quello di ricercare e caratterizzare BALOs da campioni di acqua di mare provenienti da zone riconosciute per la raccolta di molluschi bivalvi lungo il litorale adriatico della provincia di Ancona. In particolare lo scopo era quello di “catturare” BALOs specifici nei confronti di svariate prede: *Salmonella*, *E.coli*, *V.parahaemolyticus*. Inoltre su un isolato di BALOs sono state effettuate prove in vitro per testare la sua capacità predatoria nei confronti di svariati ceppi di diversa origine (clinica, alimentare, ambientale) di *V. cholerae*. I BALOs rappresentano tutt’ora, a più di 50 anni dalla loro scoperta, dei microrganismi poco conosciuti, ma con delle capacità scientificamente provate di rilevante interesse in diversi ambiti. Infatti i BALOs oltre a poter essere applicati per la eliminazione di microrganismi patogeni dalle acque e dai molluschi, possono essere considerati come potenziali agenti terapeutici per infezioni umane da batteri Gram-negativi.

Le analisi svolte hanno previsto:

- Preparazione del campione a partire da acqua di mare, mediante l'impiego di filtri con successiva preparazione e allestimento del ceppo preda, con lettura della densità ottica al biofotometro.
- Allestimento del saggio di placca, su piastre Petri, per valutare la presenza di colonie di BALOs specifiche nei confronti di *V. parahaemolyticus*, *E.coli* e *Salmonella*.
- A partire da alcuni ceppi selezionati di BALOs, allestimento di un sistema di arricchimento, con diverse prede di *Vibrio*, per verificare, sempre tramite il saggio di placca, l'abilità predatoria di *Halobacteriovorax* nei confronti di tali prede.
- Osservazione della formazione delle colonie, dopo incubazione a 22-26°C per 7 giorni, per determinare la crescita del predatore a discapito della preda.

CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI

3.1 RICERCA DI BALOS DA CAMPIONI DI ACQUA DI MARE

Sono stati utilizzati campioni che provenivano direttamente dal Mare Adriatico e il campionamento è stato eseguito per il monitoraggio delle acque.

I campioni sono stati raccolti esattamente nello stesso punto dove venivano pescate le cozze. Sono stati prelevati due campioni di acqua di mare, ogni mese, per la ricerca dei BALOs.

Complessivamente sono stati analizzati 16 campioni di acqua di mare, da Ottobre 2020 a Maggio 2021, per la ricerca dei BALOs.

Con questi campioni di acqua di mare sono state eseguite delle diluizioni e a queste diluizioni sono state aggiunte le prede per permettere ai microrganismi di crescere e di predare.

3.2 SCELTA DEI CEPPI PREDA

Per la ricerca e la crescita dei BALOs sono state utilizzate in Laboratorio come prede ceppi di campo di *E. coli*, *Salmonella napoli*, *V. parahaemolyticus* NCTC 10885 e *V. cholerae* Non O1 non O139.

È stato deciso di utilizzare queste prede sulla base degli studi effettuati da altri ricercatori; infatti, in ogni campo o ricerca, è stato possibile andare a vedere l'elevata specificità di predazione che i BALOs possiedono nei confronti di questi batteri Gram-negativi.

E. coli e *S. napoli* sono microrganismi che possono contaminare le cozze e le vongole, mentre *V. parahaemolyticus* è in grado di legarsi ai copepodi, come il *V. cholerae*, e proteggersi.

E. coli

E. coli è un batterio Gram-negativo, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, ossidasi negativo, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile per flagelli peritrichi (Fig. 5). È una delle specie principali di batteri che vivono nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo (uccelli e mammiferi, incluso l'uomo). Sono necessari per la digestione corretta del cibo. La sua presenza nei corpi idrici segnala la presenza di condizioni di fecalizzazione (è il principale indicatore di contaminazione fecale, insieme con

gli enterococchi). Il numero di cellule di *E. coli* nelle feci che un umano espelle in un giorno va da 10 a 100 milioni di unità formanti colonia (UFC) per grammo di feci. Il genere *Escherichia*, insieme ad altri generi (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, ecc.), viene raggruppato sotto il nome di coliformi. Tecnicamente il "gruppo dei coliformi" comprende batteri aerobi e anaerobi non sporigeni. Nel gruppo dei coliformi la specie *E. coli* è ampiamente rappresentata ed è in esclusivo rapporto col tratto gastrointestinale dell'uomo e degli altri animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi appartenenti a diversi generi, tra cui *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (che si caratterizzano per una potenziale capacità di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente). La specie *Escherichia coli* è un microrganismo a forma di bastoncino, non sporigeno, che cresce alla temperatura di 44,5 °C, lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano, β -D-glucuronidasi-positivo. In letteratura, la presenza di questo enzima è stata evidenziata nel 94-99,5 % dei biotipi di *E. coli*, con l'eccezione dei sierotipi O157:H7 (Enteroemorragici- EHEC). Alcuni ceppi di *E. coli enterotossigeni* (ETEC) possono portare alla cosiddetta "diarrea del viaggiatore". Risiede normalmente nell'intestino delle persone sane; tuttavia, alcuni ceppi possono causare infezioni a carico del tratto digerente (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAEC), delle vie urinarie (UPEC) o di molte altre parti del corpo.

Nelle acque destinate al consumo umano, nelle acque di fonti termali, nelle acque adibite alla balneazione e in altri tipi di matrici (per es. alimenti, cosmetici) è prescritta l'assenza di *Escherichia coli* in quanto indicatore primario di contaminazione fecale. La mancata rispondenza al valore parametrico stabilito costituisce una non-conformità del prodotto (acqua, alimento, ecc.) Per la sua ricerca nell'ambiente sono stati elaborati, negli anni più recenti, metodi basati sull'attività enzimatica della β -D-glucuronidasi (**Saggio GUS**), evidenziabile dall'idrolisi di β -glucuronidi cromogeni o fluorogeni con rilascio di composti colorati o fluorescenti; o, allo stesso modo, si usa l'**X-gal**, facendo leva sull'enzima β -galattosidasi. Queste caratteristiche, eliminando spesso la necessità di svolgere prove di conferma, permettono di ottenere risultati in tempi più rapidi e di giungere con maggiore accuratezza alla determinazione del microrganismo ricercato.

Salmonella

La *Salmonella* è un batterio Gram-negativo, che rientra nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, ossidasi negativo, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile per flagelli peritrichi, lattosio negativi (Fig. 6). Si tratta, quindi, di microorganismi che trovano il proprio habitat ideale nell'intestino di rettili, uccelli e mammiferi, incluso l'uomo.

La classificazione delle salmonelle resta un problema irrisolto.

La *Salmonella* ha come target gli enterociti ai quali aderisce. Entrano negli enterociti e nelle cellule M, si moltiplicano nell'endosoma e si spostano verso la base della cellula. Una volta liberate vengono fagocitate dai macrofagi.

S. typhi sopravvive nei macrofagi inibendo la fusione con il lisosoma (persiste nei macrofagi) e viene trasportata al torrente circolatorio.

Quando l'intestino è colpito dall'infezione, i sintomi di solito esordiscono 12-48 ore dopo l'ingestione dei batteri. Si presentano nausea e dolore addominale crampiforme, subito seguiti da diarrea acquosa, febbre e vomito. I sintomi da *Salmonella* si risolvono in 1-4 giorni. In alcuni casi, i sintomi sono più gravi e durano a lungo. Molto tempo dopo la scomparsa dei sintomi, alcuni soggetti continuano a eliminare i batteri nelle feci. Tali individui vengono chiamati portatori. Circa il 10-30% degli adulti sviluppa un'artrite reattiva (Sindrome di Reiter) settimane o mesi dopo la scomparsa della diarrea. Questo disturbo causa dolore e gonfiore, solitamente nelle anche, nelle ginocchia e nel tendine di Achille (che collega l'osso del tallone al muscolo del polpaccio). Se si sviluppa batteriemia e l'infezione si diffonde possono presentarsi altri sintomi. Per esempio, in caso di infezione a un osso, l'area sovrastante è spesso dolorabile o dolente. In caso di infezione delle valvole cardiache, può sopravvenire respiro affannoso. Se l'aorta è infettata, si prova dolore anche alla schiena e all'addome. Le persone di solito si riprendono bene, ad eccezione di quelle che

prima dell'infezione da Salmonella presentavano un disturbo, specialmente uno che indebolisce il sistema immunitario, o che manifestano complicanze dovute all'infezione.

V. parahaemolyticus

V. parahaemolyticus è un batterio Gram-negativo, a forma curva, mobile per un flagello polare, aerobio-anaerobio facoltativo, ossidasi positivo, spesso isolata dalle foci estuario e marine delle zone costiere degli Stati Uniti e di altre zone costiere dal clima tropicale/temperato di tutto il mondo (Fig. 7). Entrambe le forme patogene e non patogene dell'organismo possono essere isolate da ambienti marini, di estuario e dai frutti di mare raccolti da questi ambienti.

In generale, la maggior parte dei *V. parahaemolyticus* isolati dall'ambiente non sono patogeni. Attualmente, i ceppi patogeni sono identificati dalla presenza di uno o entrambe le emolisine TDH (emolisina termostabile diretta) e TRH (emolisina termostabile-correlati); nello specifico hanno un comportamento da patogeni quelli che lisano i globuli rossi del sangue (ceppi Kanagawa positivi); la TDH è la tossina che provoca la lisi dei globuli rossi e che può attaccare le cellule intestinali. Questa forma di gastroenterite batterica viene scatenata a causa del consumo di frutti di mare crudi o frutti di mare cotti contaminati con il prodotto grezzo: attraverso una cottura e refrigerazione corretta si riducono i rischi di infezione da parte del patogeno.

La temperatura ottimale per lo sviluppo di *V. parahaemolyticus* va dai 20°C a 35°C.

Oltre alla malattia gastrointestinale di origine alimentare, questo organismo può anche causare infezioni della ferita. Ciò avviene, sia attraverso l'esposizione di una ferita contaminata da acqua marina o acqua di estuario o attraverso ferite subite durante la manipolazione di pesce, crostacei.

V.cholerae Non O1 non O139

Il *Vibrio cholerae* venne scoperto nel 1854 da Filippo Pacini, anatomista italiano, e analizzato e studiato nel dettaglio nel 1884 da Robert Kock. Il *V. cholerae*, che fa parte della famiglia delle *Vibrionaceae*, è batterio Gram-negativo, dalla forma bastoncellare e ricurva (Antonelli et al.,2012), è mobile per la presenza di un unico flagello polare, è asporigeno, non capsulato ed ossidasi positivo (Fig. 8); il suo habitat naturale è l'acqua ed è quindi attraverso la via orale che avviene la trasmissione (La Placa, 2014). Sono conosciuti circa 200 differenti sierotipi del vibrione, tuttavia ci sono ceppi tossigeni appartenenti ai sierogruppi O139 e O1. Il sierogruppo O1 può essere di due biotipi: *Classico* ed *El Tor* i quali risultano essere responsabili delle pandemie verificatesi nel corso del tempo. I biotipi *Classico* ed *El Tor* comprendono tre sierotipi, cioè *inaba*, *ogawa* e *hikojima*.

Il colera ha come causa principale l'enterotossina colerica, la quale ha come bersaglio gli enterociti dell'intestino tenue. La enterotossina è formata da un polipeptide A (frammento A1 e frammento A2) e da cinque polipeptidi B, che si legano ai recettori gangliosidici GM1 della membrana cellulare. Una volta che la tossina si è attaccata all'enterocita, le subunità B mediano l'internalizzazione della subunità A. La subunità A, una volta penetrata nel citoplasma, si lega a microfilamenti di actina e riesce a essere trasportata nel reticolo endoplasmatico (Antonelli et al., 2012). Una volta nel reticolo la subunità A si stacca dal complesso, formato con l'actina, e agisce sull'adenilato ciclasi (enzima responsabile della trasformazione di ATP in AMP ciclico) così da determinare sia una diminuzione dell'assorbimento di NaCl dalle cellule che si trovano alla sommità dei villi, sia la fuoriuscita di ioni nel lume intestinale con conseguente accumulo di acqua (Carlone e Pompei, 2014). La patogenesi del colera è quindi caratterizzata da diarrea profusa, acquosa, ricca di potassio e, nei casi estremi, il paziente può arrivare a perdere fino a 20 litri di liquidi al giorno, con shock elettrolitico e morte. *Bdellovibrio bacteriovorus* è in grado di interagire con le cellule VBNC (Viable But Not Culturable) di *V. cholerae*, ossia cellule batteriche che sono in grado di mantenere la loro virulenza, anche per molti anni, ma che al tempo stesso riescono ad entrare in uno stato in cui non crescono e non si replicano nei supporti batteriologici convenzionali

(Roszak et al., 1987). Uno studio condotto da Markelova (Markelova, 2015), su un sistema i cui componenti comprendevano: cellule libere *Bdellovibrio*, bdelloplasti e cellule intatte di *V. cholerae*, è stato in grado di dimostrare che la concentrazione delle cellule preda, *V. cholerae* 14035, in presenza del predatore, *Bdellovibrio Bacteriovorus* 100, diminuisce durante il periodo di incubazione. Come dimostrato nella figura 2.5 a 72 ore si registra un picco di caduta della concentrazione di *V. cholerae* che passa da 4.0 log.cell/mm² iniziale a 3.0 log.cell/mm². Studi approfonditi di interazione tra BALOs e *V.cholerae*, non sono ancora stati condotti, tuttavia, ad oggi, è possibile considerare i BALOs come dei possibili agenti antibatterici anche nella purificazione di acqua contaminata da *V. cholerae* (Markelova, 2015).

È stato deciso di utilizzare queste prede sulla base degli studi effettuati da altri ricercatori; infatti, in ogni campo o ricerca, è stato possibile andare a vedere l'elevata specificità di predazione che *Bdellovibrio bacteriovorus* possiede nei confronti di questi batteri Gram-negativi.

Sono stati utilizzati *V. parahaemolyticus* NCTC 10885, *E. coli* e *S. napoli* per analizzare l'elevata selettività e specificità predatoria dei BALOs.

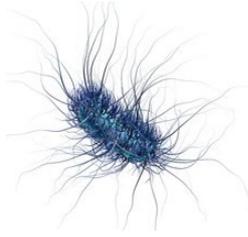


Figura 5: Morfologia di *E. coli*.



Figura 6: Morfologia di *S. napoli*



Figura 7: Morfologia di *V. parahaemolyticus*.



Figura 8: Morfologia di *V. cholerae*

3.3 PREPARAZIONE DEI CEPPI PREDA

Per l'allestimento ed il mantenimento delle prede da utilizzare negli esperimenti per la ricerca dei BALOs sono state utilizzate piastre di controllo di *E. coli*, *S. napoli* e *V.parahaemolyticus 10885* dalle quali prelevando alcune colonie ogni settimana si riallestivano piastre fresche, utilizzando i seguenti terreni solidi specifici per ogni specie batterica.

- Agar MacConkey: crescita di *E. Coli*;
- Cromogenico per Salmonella: crescita di *S. Napoli*;
- Cromogenico per vibrioni: crescita *V.parahaemolyticus 10885*;
- TSA 3% NaCl: crescita di *V.parahaemolyticus 10885*

Inoltre sono state allestite anche tre brodocolture.

- 2 tubi di BHI (Brain Heart Infusion), in cui si inoculavano colonie di *E. coli* e colonie di *S. napoli*;
- 1 tubo di Brodo Nutrient 3% NaCl, in cui si inoculavano colonie di *V.parahaemolyticus 10885*, prelevate da terreno TSA 3% NaCl.

Incubare a 37°C per 24 h.

3.4 TERRENI DI COLTURA

Per la crescita dei ceppi preda sono stati utilizzati in Laboratorio diversi terreni di coltura, ovvero l'**Agar Mac Conkey**, il **Cromogenico per Salmonella**, il **Cromogenico per vibrioni** e il **TSA al 3% NaCl**.

Il terreno **MacConkey** è un terreno sia selettivo che differenziale in grado di isolare microorganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, e differenziando i coliformi dagli enterobatteri patogeni non fermentanti il lattosio. Viene quindi utilizzato per la ricerca di *E. coli* patogeni negli alimenti, nei campioni di prodotti non sterili e nella ricerca di Gram-negativi nelle urine in piastra assieme al CLED agar (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar) che inibisce la sciamatura delle specie di *Proteus* per la mancanza di elettroliti. Ciò che dà selettività a questo terreno sono il cristalvioletto e i sali biliari, che inibiscono la crescita dei batteri Gram-positivi. Il MacConkey contiene inoltre come unica fonte energetica il lattosio: ciò permette quindi la distinzione tra batteri fermentanti il lattosio e batteri che non fermentano questo zucchero.

Il terreno è composto da:

- Peptone di gelatina 17 g/L
- Peptoni (carne e caseina) 3 g/L
- Lattosio monoidrato 10 g/L

- Sali biliari 1.5 g/L
- NaCl 5 g/L
- Rosso Neutro 0.030 g/L
- Cristalvioletto 0.001 g/L
- Agar 13.5 g/L

pH finale 7.1 ± 0.2 a 25°C .



Figura 9: Crescita di *E.coli* su terreno MacConkey

Il **Chromogenic Salmonella agar** è un terreno selettivo e diagnostico utile per l'isolamento di *Salmonella spp.* da campioni clinici.

I terreni cromogeni sono inclusi nelle norme ISO per determinare *Salmonella* nelle acque e negli alimenti.

I peptoni forniscono carbonio, azoto, vitamine e oligoelementi per la crescita batterica. I composti selettivi incorporati nel mezzo sono la cefsulodina, una

cefalosporina di terza generazione che ha un'attività inibitoria molto specifica verso *P. aeruginosa* e *S. aureus*, desossicolato di sodio che sopprime la crescita dei batteri Gram-positivi e di alcuni batteri Gram-negativi e Tergitol 4, attivo principalmente contro la crescita di *Proteus spp.*

La differenziazione dagli altri microrganismi che possono crescere sul terreno è ottenuta con la presenza di un substrato cromogeno (**magenta caprilato**) sul quale agisce una esterasi specifica di Salmonella con liberazione di un metabolita color rosso magenta e con la presenza di un derivato cromogeno glucopiranosidico sul quale agisce la β -glucosidasi con liberazione di un metabolita color verde-blu.

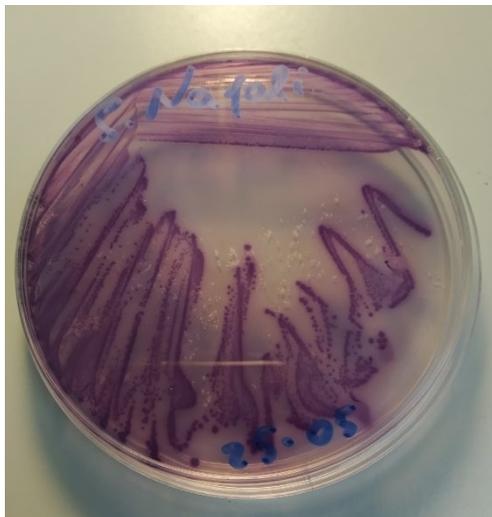


Figura 10: Crescita di *Salmonella* su CSA.

Gli altri terreni utilizzati sono il **Cromogenico per vibrioni** e il **Tryptic Soy Agar** addizionato con il 3% NaCl per permettere la crescita di *V. parahaemolyticus* (infatti solo il *V. cholerae* è in grado di crescere anche in assenza di NaCl). TSA 3% NaCl è costituito da un peptone di caseina e da un peptone di soia che forniscono gli elementi necessari alla crescita di una larga varietà di microrganismi e da cloruro di sodio per mantenere l'equilibrio osmotico. È uno dei terreni più largamente impiegati in microbiologia sia clinica che industriale ed ambientale. Trova applicazione nella sub-coltura dei ceppi isolati dai campioni, per la purificazione delle colonie e per il mantenimento delle colture. È indicato per l'enumerazione dei microrganismi nei prodotti non sterili con metodo armonizzato EP, USP, JP (farmacopea europea, degli USA e giapponese).

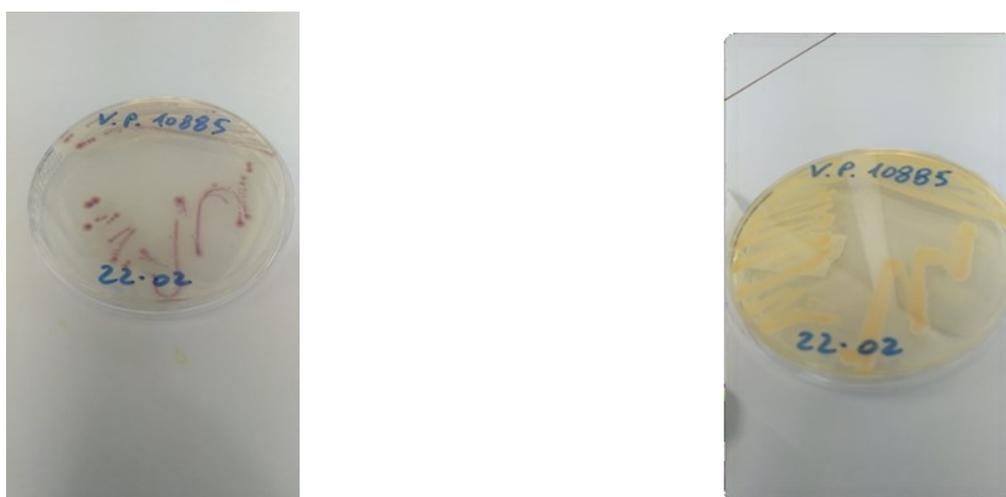


Figura 11: A sinistra piastra di terreno Cromogenico per vibrioni; a destra piastra di TSA 3% NaCl.

Le brodocolture utilizzate per la crescita di questi tre microrganismi sono il **Brain Heart Infusion (BHI)** e il **Brodo Nutrient 3% NaCl (BND)**.

Il **BHI** è un terreno di uso generale, basato sulla formulazione di Edward Rosenow del 1919, modificata successivamente da Russell Haden nel 1923. Il brodo BHI moderno utilizza in genere infusi in polvere di cuore e cervello, piuttosto che tessuto cerebrale e cardiaco e include il fosfato disodico come tampone, piuttosto che il carbonato di calcio utilizzato da Rosenow e Haden.

BHI è indicato per la coltivazione di una larga varietà di microrganismi, compresi i patogeni a crescita fastidiosa, aerobi e anaerobi, lieviti e muffe, impiegando le temperature e i tempi di incubazione adatti.

Il brodo BHI viene utilizzato per la brodocoltura stafilococcica (*S. aureus*) per eseguire il test della coagulasi (ovvero per vedere se il fibrinogeno viene convertito indirettamente in fibrina).

BHI può essere anche utilizzato per avviare il processo di crescita batterica per il test dell'ureasi di *Helicobacter pylori* (l'ureasi può scomporre l'urea in CO₂ e NH₃. Il test può rilevare questa reazione modificando il valore del pH. La variazione del valore di pH è indicata da un indicatore di colore).

Gli infusi di cuore e cervello ed il peptone sono fonti di azoto, carbonio, vitamine, minerali per la crescita microbica, il glucosio costituisce una elevata

fonte di energia, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico e il sodio fosfato bibasico è incluso come sistema tampone.

Il **BND 3% NaCl** è un terreno di coltura per uso generale raccomandato per la coltivazione di microrganismi non esigenti, usato per la crescita di *V. parahaemolyticus* che per crescere ha bisogno di elevate concentrazioni saline.

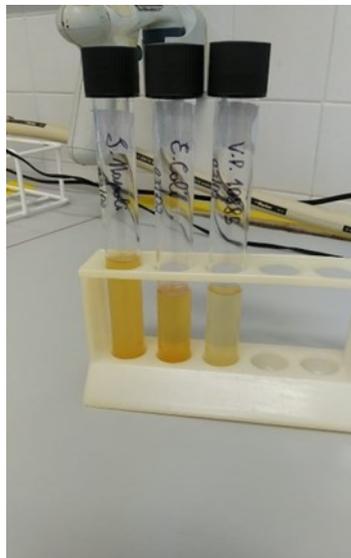


Figura 12: Brodocolture di BHI e BND.

Per il Plaque Assay invece sono stati utilizzati il **PP 20 Top Agar fuso al 3%** e il **Bottom Agar**.

Il PP 20 Top Agar 3% è costituito da 1000 ml di acqua deionizzata, 7,50 g di agar, 30 g di Sale per acqua marina artificiale e 1 g di peptone di carne e caseina.

Il Bottom agar è costituito da 1000 ml di acqua deionizzata, 15 g di agar, 30 g di Sale per acqua marina artificiale e 1 g di peptone di carne e caseina.

Per l'arricchimento dei BALOs è stata utilizzata la brodocoltura di

Bdellovibrio Bacteriovorus Medium Broth.

Questa brodocoltura è composta da 1000 ml di acqua deionizzata, 0,30 g di calcio cloruro, 1 g di Polypeptone Peptone, 0,60 g di magnesio cloruro esaidrato e 0,30 g di estratto di lievito.

3.5 ARRICCHIMENTO BALOS

Bdellovibrio bacteriovorus costituisce il cluster BALOs (*Bdellovibrio and like organisms*).

- Vengono preparate tante Falcon quanti sono i campioni per l'arricchimento;
- In ogni Falcon vengono inseriti 2 ml di acqua demineralizzata al 3% NaCl;
- Viene presa la brodocoltura di *V. parahaemolyticus 10885* e vengono prelevati 100 μ L;
- I 100 μ L della brodocoltura di *V. parahaemolyticus 10885* vengono pipettati in ognuna delle Falcon;
- Dall'arricchimento vecchio, vengono prelevati 20 μ L di campione;
- I 20 μ L di campione vengono pipettati in ognuna delle Falcon.

Successivamente si procede alla preparazione di tre brodocolture di "Bdellovibrio Bacteriovorus Medium Broth":

- 0,3 g di NaCl in ognuna delle brodocolture;
- Prelevare con siringa 2 ml di campione dalle brodocolture vecchie;
- Versare con siringa e filtro 1,5 ml di campione nelle brodocolture nuove;

- Sulle brodocolture porre il codice di identificazione: **GDS1+COL**, **GDS2+COL**, **M7+NAP**;
- In GDS1+COL e in GDS2+COL pipettare 150 μ L di soluzione *E. coli* prelevata da BHI;
- In M7+NAP pipettare 150 μ L di soluzione *S. naponi* prelevata da BHI.

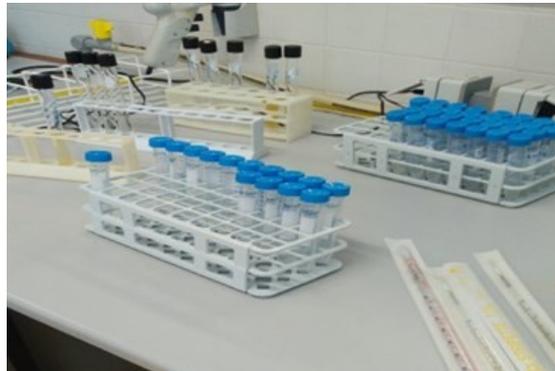


Figura 13: Arricchimento BALOs.

Le Falcon e le brodocolture di “*Bdellovibrio bacteriovorus* Medium Broth” sono posti in agitatore termostatico a 250 rpm a 26°C oppure vengono incubati a 25°C.

3.6 PLAQUE ASSAY PER ARRICCHIMENTO

Il Plaque Assay (Saggio della placca) serve a vedere se, dopo la crescita, i BALOs sono riusciti a predare.

Se riescono a predare, sulla piastra sono visibili delle placche.

- Preparazione 6 eppendorf con 900 μ L di Acqua Demineralizzata al 3% di NaCl;
- Preparazione 6 Falcon da 50 ml e aggiungere 7,5 ml di Acqua Demineralizzata al 3% di NaCl;
- Con una brodocoltura di Brodo Nutrient al 3% contenente *V. parahaemolyticus 10885* e Brodo Nutrient al 3% vuoto misurare la OD (Densità Ottica);
- Densità ottica viene misurata al Biofotometro;
- Il Brodo Nutrient 3% vuoto viene utilizzato per fare il bianco;
- Prelevare 100 μ L dal Brodo Nutrient 3% con *V. parahaemolyticus 10885* e misurare la Densità Ottica;
- La Densità ottica del *V. parahaemolyticus 10885* deve essere pari a 0,20;

- Se risulta maggiore, in una falcon vuota aggiungere 2 ml di ceppo preda e diluire il ceppo preda con 2 ml di Brodo Nutrient 3% utilizzato per fare il bianco;
- Ripetere questo passaggio fin quando la Densità ottica misurata raggiunge 0,20 (anche 0,23 va bene);
- 100 μ L della falcon utilizzata per la misura della Densità ottica nella prima eppendorf (-1) e da qui le diluizioni (fino alla -6);
- Dalle eppendorf -4, -5 e -6 prelevare 1 μ L di campione e versarlo nelle prime Falcon -4, -5 e -6;
- Successivamente dalle eppendorf -4, -5 e -6 prelevare 10 μ L di campione e versarlo nelle seconde Falcon -4, -5 e -6;
- Aggiungere 7,5 ml di Top Agar al 3% in ambedue le Falcon -4, -5 e -6 e versare il tutto nel Bottom Agar 3%;
- Lasciar solidificare;
- Incubare a 25°C.

Le placche si osservano dopo 7 giorni.

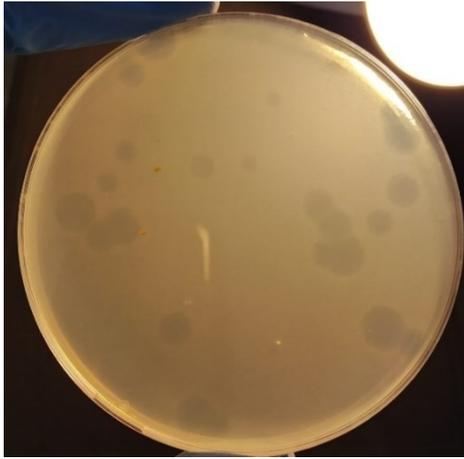


Figura 14: Placche di lisi dei BALOs

3.7 PLAQUE ASSAY DA ACQUA DI MARE

Il campione arriva in accettazione in due Falcon da 50 ml insieme ad un campione di mitili prelevati nella stessa zona di campionamento. L'accettazione riporta sulle Falcon il numero di accettazione del campione di mitili e la temperatura dell'acqua al momento del prelievo, quindi conserva il campione a +4°C fino al momento dell'analisi. Il campione va analizzato entro 24/48 h dall'arrivo in laboratorio.

- 1) Filtrare almeno 30 ml del campione di acqua di mare mediante filtro 0,45 µm, sostituendo il filtro ogni 10 ml. Questo passaggio serve per rimuovere dal campione altri microrganismi presenti eccetto i BALOs. Poiché questo passaggio comporta comunque la perdita di una parte di BALOs, cambiando spesso il filtro si riduce questa perdita.
- 2) Preparare le diluizioni del campione di acqua di mare utilizzando come diluente acqua di mare sterile al 1,5% di salinità se la preda è *E. coli* o *Salmonella*; acqua di mare sterile al 3% di salinità se la preda è un *Vibrio*. Poiché ogni campione o diluizione va eseguita in triplicato, allestire ogni diluizione con 27 ml di diluente e 3 ml del campione o diluizione precedente.

3) Allestire due controlli negativi uno all'inizio ed uno alla fine del processo utilizzando, al posto del campione o di una sua diluizione, solo acqua di mare sterile.

La mattina del saggio, preparare una brodocoltura del ceppo preda partendo da una colonia in purezza prelevata da una coltura di 24 h su terreno solido nutriente o selettivo.

Incubare i tubi a 37°C o a 26°C per circa 2 o 3 h fino a che il mezzo raggiunga la corrispondente densità ottica che deve essere di 0,20 per *V. parahaemolyticus* e 0,5 per *E. coli* e *Salmonella*.

Dopo le 2/3 h di incubazione misurare la densità ottica al Biofotometro procedendo nel seguente modo:

- Fare un bianco con 100 µL di brodo sterile (usare il terreno utilizzato per la brodocoltura)
- Leggere la brodocoltura: se la densità ottica è inferiore al valore atteso, continuare l'incubazione; se la densità ottica è superiore al valore atteso diluire con lo stesso terreno usato per la brodocoltura.

Per ogni campione, diluizione o replica, preparare ed identificare una piastra di Bottom agar e Falcon sterile da 50 ml.

Procedere dispensando nella Falcon nell'ordine:

- 7.5 ml dell'acqua di mare test, precedentemente filtrata (filtro 0,45 μm)
- 1 ml di coltura della preda (densità ottica di 0,20 per *V. parahaemolyticus* e di 0,5 per *E. coli* e *Salmonella*).
- 7.5 ml di Top agar fuso e mantenuto a 48°C in bagno termostatico.

Invertire ogni tubo 3 volte per mescolare adeguatamente e versare velocemente sulla superficie della piastra di Bottom agar precedentemente preparata. Fare un tubo alla volta in modo tale che l'agar non inizi a solidificare prima di essere piastrato. Dopo che l'agar si è solidificato nella piastra (circa 10 minuti), coprire e invertire le piastre ed incubarle a 22-26°C fino a 7 giorni.

Osservare le piastre quotidianamente per verificare la formazione delle placche entro lo strato delle cellule preda. Le placche raggiungono di solito un diametro che va dai 3 mm ai 2 cm (alcune volte più grandi) in pochi giorni. Sono piccole se sono troppo cariche.

Filtrare il campione di acqua di mare mediante filtro da 0,45 μm per allontanare i vibroni naturali eventualmente presenti nel campione tal quale e altri corpuscoli.

Preparare le diluizioni del campione mediante acqua di mare sterile, in modo tale che, in caso di campione positivo ai BALOs, si ottengano piastre con un numero contabile di colonie.

Se il campione risulta positivo, intorno al terzo/quinto giorno compaiono placche. Dal quinto al settimo giorno le placche presenti sulle 3 piastre di ogni diluizione ed esprimere il risultato come segue:

$$N_{\circ} \text{ placche} = (\Sigma \text{ placche} / \text{tot } \mu\text{L}) \times 1/d$$

Il risultato viene espresso come UFP/ml.

3.8 PLAQUE ASSAY PER CAMPIONI DI ACQUA AMBIENTALE

La mattina del saggio preparare una brodocoltura di *V. parahaemolyticus* inoculando un tubo contenente Brodo Nutrient 3% NaCl con una colonia di *V. parahaemolyticus* prelevata da un overnight su piastra di TSA 3%.

Incubare i tubi a 26°C a 250 rpm fino a che il mezzo raggiunga la OD600 di circa 0,20. Generalmente impiega circa 3 h. Per accelerare i tempi la brodocoltura può essere incubata a 37°C ed impiega circa 2 h per raggiungere OD600 di circa 0,20.

Il Plaque Assay si esegue combinando in una Falcon sterile da 50 ml, nel seguente ordine:

- 7,5 ml di Top agar fuso e mantenuto a caldo a 48/50°C in bagno termostatico;
- 1 ml di coltura di *V. parahaemolyticus* ospite (OD600 di 0,20);
- 7,5 ml dell'acqua di mare test, precedentemente filtrata (filtro 0,45 µm).

Invertire ogni tubo tre volte per mescolare e piastrarlo velocemente sulla superficie del Bottom agar precedentemente preparato. Fare un tubo alla volta in modo tale che l'agar non inizi a solidificarsi prima di essere piastrato.

Dopo che l'agar si è solidificato nella piastra (circa 10 minuti), coprire e invertire le piastre ed incubarle a 22-26°C fino a 7 giorni. Osservare le piastre quotidianamente per verificare la formazione di placche entro lo strato delle cellule ospiti di *V. parahaemolyticus*.

3.9 BIOFOTOMETRO

Il Biofotometro è stato utilizzato per la misurazione della Densità Ottica raggiunta dal *V. parahaemolyticus* e da *E. coli* e *S. napoli* durante l'incubazione overnight.

La OD600 (ovvero la Densità Ottica con una lunghezza d'onda pari a 600 nm) deve essere 0,20 per *V. parahaemolyticus* e 0,5 per *E. coli* e *S. napoli*.

Il Biofotometro viene utilizzato molto spesso per la determinazione della turbidimetria di colture microbiologiche.

Il Biofotometro è un fotometro UV-VIS che serve per la misurazione di liquidi in cuvette. Poiché i dati di misurazione con lunghezze d'onda fisse sono innalzati, il dispositivo è particolarmente adatto per applicazioni nel campo della biologia molecolare e delle biotecnologie.

Il Biofotometro fornisce i risultati sul display dell'apparecchio.

Il Biofotometro non deve essere esposto alla luce solare diretta e non deve essere esposto a variazioni di temperatura.

I ceppi preda sono stati pipettati in apposite cuvette per la lettura della densità ottica.

Le cuvette devono essere trasparenti per tutta la relativa lunghezza d'onda misurata.

La cuvetta che contiene la soluzione del ceppo preda non deve presentare polvere, impronte digitali e graffiature.

La cuvetta va posizionata in maniera tale che la finestra ottica della cuvetta sia rivolta verso il percorso ottico.

3.10 PCR

La Polymerase Chain Reaction («reazione a catena della polimerasi»), è stata ideata nel 1983 da Kary Mullis (prima pubblicazione apparsa nel 1985, Premio Nobel per la Chimica nel 1993), ha avuto negli anni successivi un tale sviluppo da rivoluzionare molti campi della ricerca di base e applicata.

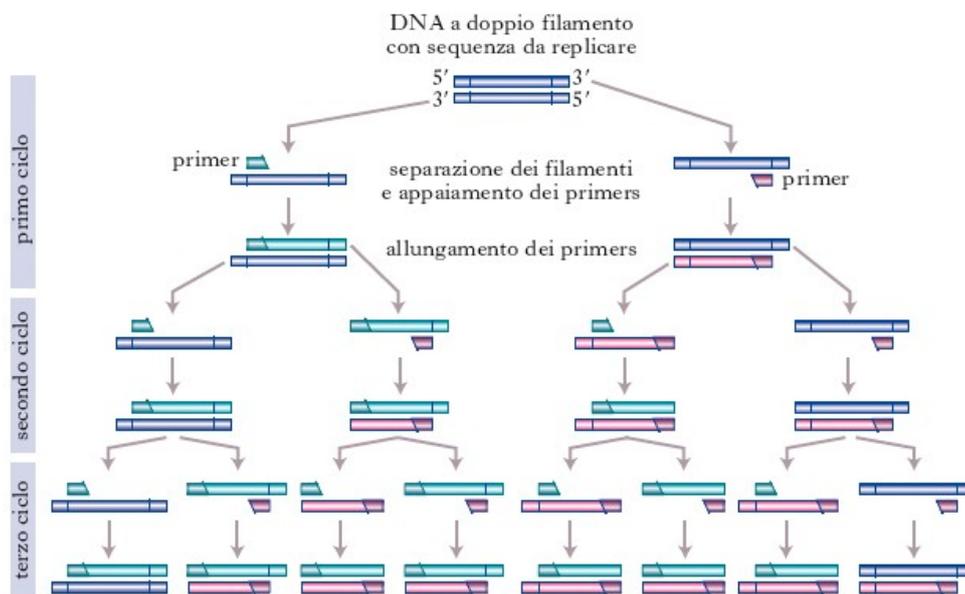


Figura 15: Rappresentazione della PCR

(Immagine presa dall'Enciclopedia Treccani)

La procedura descrive le modalità operative per l'identificazione molecolare di ceppi presumibilmente appartenenti alla specie *Bacteriovorax spp.*

Questa procedura viene applicata a colonie presunte di *Bacteriovorax spp.*

isolate da campioni di acqua marina tramite la tecnica del Plaque Assay oppure da un arricchimento selettivo.

I primer che sono stati utilizzati sono **BAC676-F (Forward)** e **BAC1442-R (Reverse)** (Davidov et al.,2006; Richards et al., 2013) specifici per il gene rRNA 16S per *Bacteriovoraceae*.

La procedura tecnica si basa sulle seguenti fasi:

- Estrazione del DNA genomico dalle placche formate sul doppio strato del terreno colturale solido mediante tecnica del Plaque Assay;
- Amplificazione della sequenza genica specifica di *Bacteriovorax spp.* mediante PCR end-point;
- Analisi degli amplificati mediante elettroforesi in gel di agarosio.

L'identificazione del gene target viene effettuata mediante PCR end-point, metodo biomolecolare nel quale il DNA specifico opportunamente estratto, è amplificato e successivamente analizzato mediante elettroforesi in gel di agarosio o altro sistema di rilevazione dei prodotti della PCR.

- Procedere alla preparazione del campione da sottoporre alla prova.
- Rinfrescare l'arricchimento ottenuto partendo da una placca presunta di BALOs e incubare i tubi a 25°C per 48-72h.
- Preparare un arricchimento del ceppo batterico di riferimento partendo da uno stock a -80°C e incubare i tubi a 25°C per 48-72 h.

- Accendere il termociclatore (è uno strumento di laboratorio in grado di condurre automaticamente le determinate variazioni cicliche di temperatura necessarie all'amplificazione enzimatica di sequenze di DNA in vitro) e selezionare il programma specifico.

Per ogni sessione di PCR allestire un controllo negativo di amplificazione (CA-) con dH₂O (acqua biologia molecolare) o acqua nucleasi free al posto del DNA ed un controllo positivo (CA+) con il DNA estratto del ceppo batterico di riferimento.

Nell'area adibita alla preparazione della Mix:

- Predisporre un supporto per provette PCR;
- Scongellare i reagenti (Acqua per biologia molecolare = 24,75 µL, tampone per PCR 5x = 10 µL, MgCl₂ = 6 µL, dNTPs = 4 µL).

Identificare le provette per PCR con il numero di accettazione dei campioni e quelle dei controlli: CE-, CA- e CA+;

- Miscelare per inversione o mediante l'uso della pipetta, i reagenti scongelati;
- Preparare la Mix in una provetta sterile considerando per (n+1) campioni se $n < 10$, per (n+2) campioni se $n > 10$;
- Prendere la Taq solo al momento in cui occorre addizionala e centrifugarla per alcuni secondi;

- Aggiungere la Taq alla mix e, subito dopo l'utilizzo, riporla in congelatore insieme agli altri reagenti;
- Miscelare delicatamente;
- Dispensare in ogni provetta per PCR 23 μL della mix;
- Aggiungere nella provetta destinata al CA-, al posto del DNA, 2 μL di dH₂O o acqua nucleasi free e trasferire le provette chiuse contenenti la mix nell'area destinata all'estrazione del DNA;
- Aggiungere in ciascuna provetta 2 μL di DNA estratto e 2 μL del controllo positivo.

Spostarsi nella stanza del termociclatore per PCR.

- Effettuare l'amplificazione nel termociclatore: **Denaturazione iniziale:** 94°C/1min; **Denaturazione:** 94°C/1min; **Annealing:** 56°C/1min (è l'unica fase la cui temperatura può essere modificata dall'operatore. È stata utilizzata temperatura pari a **53°C**); **Estensione:** 72°C/1min. **45 cicli di PCR;**
- Terminata l'amplificazione procedere all'analisi dei prodotti di PCR o conservare le provette a 5°C.

3.11 CORSA ELETTROFORETICA

L'elettroforesi su gel di agarosio (polimero naturale di D-galattosio e 3,6 anidro L-galattosio) si basa sul principio per cui il DNA, essendo costituito da unità ripetitive contenenti gruppi fosfato (polarità negativa), può migrare in un campo elettrico verso il polo positivo in funzione delle dimensioni. La velocità di migrazione dipende dal peso molecolare delle molecole di acido nucleico, dalla percentuale dell'agarosio nel gel e dal voltaggio applicato. Il gel d'agarosio ha la funzione di setaccio molecolare: variando la concentrazione del polimero, si creano nel gel maglie di diversa grandezza che consentono di separare le molecole in base al peso molecolare (da circa 50 bp a 20 kb circa). Inoltre i frammenti di più piccole dimensioni migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi: la mobilità elettroforetica è infatti inversamente proporzionale al logaritmo del peso molecolare.

Preparare i campioni da caricare sul gel in modo da diluire il Loading Dye (soluzione contenente coloranti inerti che permette l'addensamento del campione e la visualizzazione della corsa elettroforetica) alla concentrazione 1X fino ad ottenere un volume complessivo compreso fra i 5 e i 15 μL ; nel caso di amplificati di PCR con buffer di reazione già contenente un Loading Dye caricare direttamente su gel 10-12 μL di campione tal quale.

Per la preparazione del gel d'agarosio:

- Diluire il tampone di corsa concentrato (TBE 5X o TAE 50X) alla concentrazione 1X in H₂Odd (acqua demineralizzata);
- Pesare l'agarosio nella quantità necessaria ad ottenere la percentuale d'uso;
- Sciogliere l'agarosio nel tampone precedentemente diluito in una beuta di vetro pyrex;
- Portare ad ebollizione in forno a microonde per 5-10 minuti a 500-650 W fino a completa chiarificazione della soluzione;
- Prendere la beuta dal microonde indossando occhiali di protezione e guanto anticalore;
- Recarsi sotto cappa chimica e lasciar raffreddare per qualche minuto (circa 5-10 minuti) facendo attenzione a non far solidificare il gel nella beuta (l'agarosio solidifica a temperature inferiori a circa 35-40°C) agitando periodicamente con delicatezza;
- Aggiungere sotto cappa chimica il gel Red (sostituto del Bromuro d'Etidio) in concentrazione finale pari a 0,5 µg/ml e mescolare lentamente evitando la formazione di bolle;
- Colare il gel nell'apposito supporto precedentemente preparato con i pettini ed i supporti laterali adeguati; controllare che non si formino bolle d'aria;

- Lasciar solidificare il gel per circa 20-30 minuti sotto cappa chimica;
- Togliere i pettini ed i supporti laterali;
- Immergere il gel nella cella per elettroforesi contenente lo stesso tampone utilizzato per la sua preparazione;
- Caricare il gel sulla base dell'ordine di campioni riportato nel Quaderno di Laboratorio specifico per l'applicazione d'interesse;
- Caricare in singolo un campione per ogni pozzetto ed un volume adeguato di Marker di peso molecolare (generalmente di 5-6 μL) all'inizio e/o alla fine di ogni serie di campioni;
- Chiudere il coperchio della camera elettroforetica, collegare i cavi dell'alimentazione, applicare un voltaggio di 1-5 V/cm (misurata come distanza tra l'elettrodo positivo e l'elettrodo negativo) ed avviare la corsa;
- Accertarsi che ci sia passaggio di corrente elettrica (verifica dell'ampereaggio dell'alimentatore);
- Valutare lo stato dell'elettroforesi controllando la migrazione delle bande del colorante contenute nel Loading Dye;
- A fine corsa, quando la banda corrispondente al colorante è a circa $\frac{3}{4}$ del gel, spegnere l'alimentatore, aprire il coperchio dell'apparato

elettroforetico e trasferire il gel sul transilluminatore UVA per valutare la presenza delle bande d'interesse.

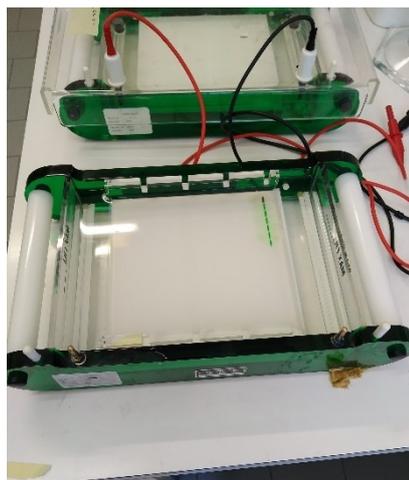
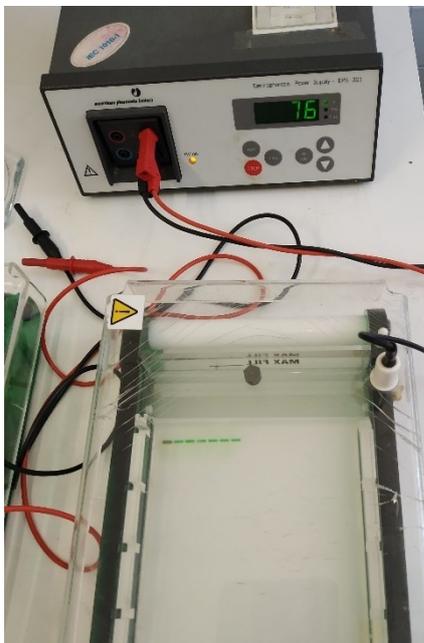


Figura 16: Corsa Elettroforetica

3.12 SAGGIO DI SPECIFICITA' DI HALOBACTERIOVORAX

Vengono testati come preda svariati ceppi di *Vibrio* di differente origine e fonte di isolamento (Tabella 1).

Ceppo preda	Fonte	Origine	Anno
<i>Non O1/O139 V. cholerae</i>	Tessuto subcutaneo	Acqua di mare del Mare Adriatico	2009
<i>Non O1/O139 V. cholerae</i>	Acqua marina	Mare Adriatico	2011
<i>Non O1/O139 V. cholerae</i>	Feci	Molluschi bivalvi	2012
<i>Non O1/O139 V. cholerae</i>	Molluschi	Mare Adriatico	2014

Tabella 1: Vari ceppi di *Vibrio* con diversa origine e fonte di isolamento

I ceppi di *V.cholerae*, prelevati da una piastra di terreno selettivo e differenziale, vengono seminati su piastra con LB (Luria-Bertani) (Tabella 1) o su TSA (Tryptic Soy Agar) al 3% di NaCl per favorirne la crescita.. Le piastre vengono poi incubate a 37°C per 24 ore, quindi si prelevano 3-4 colonie e si allestisce una brodocoltura in un tubo contenente BN (Brodo Nutrient) al 3 % di NaCl. I tubi vengono poi incubati a 37°C per 3 ore per consentire la crescita del ceppo preda fino alla densità ottica, letta al

biofotometro (Eppendorf, Hamburg, Germany), di 0.20 (pari a pari a circa 1.8×10^8 UFC/ml).

Una volta raggiunto il risultato voluto al biofotometro (Eppendorf, Hamburg, Germany, riguardante la concentrazione della preda, si allestisce un tubo da centrifuga, sterile e in propilene, da 15 ml (Corning Science Mexico, Tamaulipas, Mexico) contenente:

- 2 ml di acqua di mare, precedentemente filtrata con filtro per siringa da 0.22 μm con membrana in polietersulfone (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Germany).
- 200 μL del ceppo preda di *Vibrio cholerae*.
- 20 μL di *Halobacteriovorax* ottenuto da un precedente arricchimento oppure da una coltura di riferimento.

Ogni tubo viene poi incubato a 26° C in agitazione a 250 rpm per almeno 48 ore. Dopo questo periodo di incubazione la crescita del predatore sarà presuntivamente dimostrata per chiarificazione del mezzo liquido e confermata attraverso il saggio di placca. Precedenti titolazioni di BALOs ottenute in queste condizioni sperimentali hanno dimostrato che la concentrazione ottenuta dopo un arricchimento è di circa 10^6 PFU/ml.

CAPITOLO 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati analizzati, da Ottobre 2020 a Maggio 2021, due campioni di acqua di mare ogni due mesi per otto mesi (totale campioni: 16).

Per l'analisi dei campioni di acqua di mare per la ricerca di *Halobacteriovorax* è stata presa in considerazione anche la temperatura dell'acqua di mare al momento del prelievo (Tabella 2).

In seguito al Plaque Assay, tutti i campioni di acqua di mare hanno dato esito negativo sia per *V. parahaemolyticus* che per *E. coli* e *S. napoli*, eccetto un campione di Marzo 2021 positivo per BALOs contro *E. coli* e *S. napoli* (n° accettazione: **11502**) e di un campione di Ottobre 2020 positivo per BALOs contro *V. parahaemolyticus*.

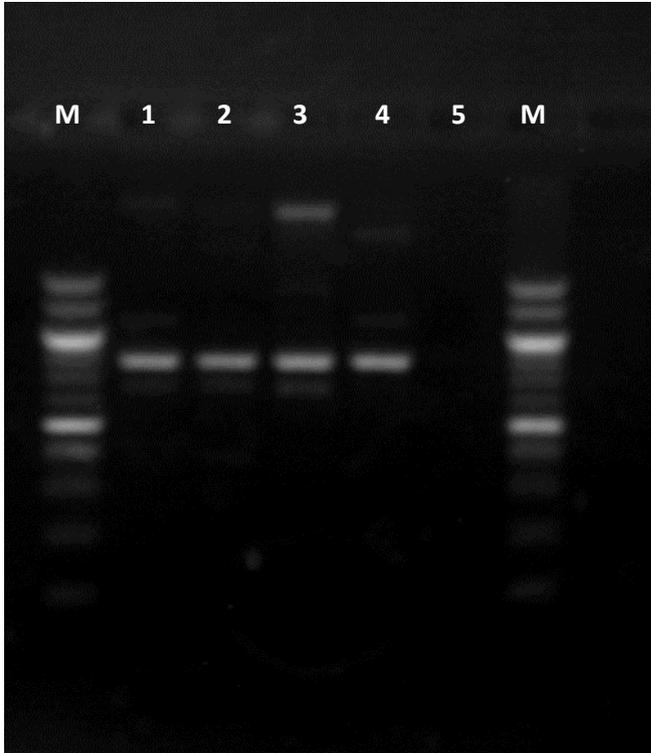
Su questi campioni è stata eseguita prima la PCR per l'amplificazione del DNA e successivamente l'elettroforesi per l'analisi degli amplificati.

Mese	T °C 1° camp.	T °C 2° camp.	<i>V.P.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. napoli</i>
Ottobre	20°C	22°C	Positivo	Negativo	Negativo
Novembre	12°C	12°C	Negativo	Negativo	Negativo
Dicembre	10°C	10°C	Negativo	Negativo	Negativo
Gennaio	9°C	12°C	Negativo	Negativo	Negativo
Febbraio	10°C	9°C	Negativo	Negativo	Negativo
Marzo (11502)	15°C	15°C	Negativo	Positivo	Positivo
Aprile	10°C	12°C	Negativo	Negativo	Negativo
Maggio	14°C	12°C	Negativo	Negativo	Negativo

Tabella 2- Temperature dei campioni analizzati con Plaque Assay e PCR; gli esiti delle analisi evidenziati in neretto corrispondono alla temperatura del campione evidenziata in neretto.

La PCR ha confermato che gli isolati appartenevano al genere

Halobacteriovorax.



I campioni positivi di *Halobacteriovorax* verso *E. coli*, *S. napoli* e *V. parahaemolyticus*, come si può vedere nella figura della corsa elettroforetica, sono indicati dai n° 1, 2 e 3.

Sempre nella figura della corsa elettroforetica si possono vedere il marcatore, indicato con la lettera M, il controllo positivo (CTRL+) indicato con il n° 4 e il controllo negativo (Acqua nuclease free) indicato con il n° 5.

In questa tabella (Tabella 3) sono invece riportati i risultati della sperimentazione condotta per dimostrare l'attività predatoria e la specificità nei

confronti di svariati ceppi di *Vibrio cholerae* del ceppo di *Halobacteriovorax* verso *V.parahaemolyticus* isolato da acqua marina nel mese di Maggio .

PREDATORE	PREDA	ESITO
HBX Vp	<i>V. cholerae</i> 41918	+
HBX Vp	<i>V. cholerae</i> 810/6	+
HBX Vp	<i>V. cholerae</i> 39137	+
HBX Vp	<i>V. cholerae</i> 41	+

Tabella 3: Risultati per la dimostrazione dell'attività predatoria di *Halobacteriovorax* su ceppi di *V. cholerae*

Come detto in precedenza, infatti, la concentrazione di *Halobacteriovorax* e dei BALOs in generale, può cambiare nell'acqua di mare, in base alla stagionalità. Nei mesi invernali la temperatura dell'acqua di mare scendendo può essere la causa della non presenza, o comunque di una scarsa concentrazione, di *Halobacteriovorax* dato che quest'ultimo ha bisogno 25-30°C per sopravvivere e svolgere la sua attività predatoria. Per quanto riguarda la salinità, solitamente la percentuale ottimale che consente la crescita del predatore è al 3-3.5% (Li et al., 2011). È inoltre possibile che, durante il periodo invernale, i BALOs non siano presenti in acqua di mare, né superficiale né profonda, perché possono concentrarsi nei sedimenti marini, oppure che la preda a basse temperature non riesca a sopravvivere e di conseguenza il predatore non potrà moltiplicarsi.

I Campioni positivi ai BALOs ottenuti anche in questo caso nei mesi in cui la temperatura dell'acqua superava i 15°C hanno confermato che lo sviluppo di questi predatori autoctoni del mare Adriatico non si sviluppano nei mesi invernali ed autunnali.

Tuttavia lo sviluppo dei BALOs, come già detto, possono essere influenzate anche da molti altri fattori quali ad esempio: vento, correnti, fluttuazioni dei parametri chimico-fisici delle acque, vicinanza del campione rispetto alla spiaggia o a sedimenti rocciosi.

Questi risultati, sia pure parziali dato che si è in piena sperimentazione e molti altri campioni debbono essere analizzati nell'arco temporale di almeno un anno, dimostrano tuttavia che BALOs contro *V.parahaemolyticus*, *E.coli* e *Salmonella spp.* sono presenti nella zona di raccolta dei molluschi bivalvi da noi campionata in Adriatico centrale.

Questa sperimentazione rappresenta il punto di partenza con l'obiettivo finale di selezionare e caratterizzare BALOs idonei da utilizzare negli impianti di depurazione dei molluschi bivalvi al fine di ottenerne la sanificazione da batteri patogeni quali *V.parahaemolyticus*, *V.cholerae* e *Salmonella spp.* Dato che i molluschi bivalvi sono organismi filtratori essi sono in grado di raccogliere e concentrare al loro interno batteri e virus naturalmente presenti nelle acque marine, inclusi i BALOs che in questo modo possono svolgere la loro azione

predatoria nei confronti di Vibrioni ed altre prede, direttamente all'interno del mollusco, incrementandone la salubrità.

Come affermato in precedenza *Halobacteriovorax* è predatore di batteri Gram-negativi, tra cui i Vibrioni, per questo nel corso della sperimentazione si è voluto testare se, oltre al *V. parahaemolyticus*, questo esercitasse attività predatoria anche nei confronti di ceppi appartenenti ad un'altra specie patogena di Vibrio e cioè *V. cholerae*. A differenza della sperimentazione precedente qui si è voluto osservare se *Halobacteriovorax* avesse una attività predatoria nei confronti di *V. cholerae* senza effettuarne la titolazione. La positività (+) delle analisi condotte su diversi ceppi di *V. cholerae* è stata esclusivamente dimostrata con la comparsa delle placche di citolisi del campione tq, senza effettuare ulteriori diluizioni necessarie all'eventuale titolazione. In nessun campione si è registrato esito negativo (-). La sperimentazione è stata condotta impiegando diversi ceppi di *V. cholerae* di origine clinica, alimentare o ambientale in quanto si voleva dimostrare come *Halobacteriovorax* avesse uno spettro d'ospite allargato a svariati ceppi preda.

Inserire nel mercato prodotti alimentari di origine ittica che siano scevri da batteri patogeni è di grande importanza per salvaguardare la salute del consumatore. In questa ottica si è voluta testare l'abilità predatoria di *Halobacteriovorax* nei confronti di alcuni patogeni frequentemente presenti nei

molluschi bivalvi, quali *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. Le attuali tecniche di depurazione dei molluschi bivalvi non sono efficaci nei confronti dei vibrioni per cui tale tesi rappresenta un incipit per dimostrare come l'impiego di BALOs possa rappresentare una valida alternativa alle convenzionali tecniche di purificazione. Questi risultati intanto dimostrano che BALOs attivi nei confronti di vibrioni patogeni sono naturalmente presenti nelle acque di raccolta dei molluschi bivalvi in Adriatico Centrale dove probabilmente esplicano l'azione di modulatori naturali. Inoltre, il ceppo di *Halobacteriovorax* indigeno precedentemente isolato e caratterizzato è risultato efficace a livello sperimentale nel predare svariati ceppi di diversa origine di *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae*. Naturalmente questi dati sono ancora preliminari. Per valutare il livello ed andamento dei BALOs naturali nell'area marina selezionata prelievi dovranno essere effettuati a cadenza regolare per almeno un anno. Inoltre, per valutare l'efficacia del ceppo indigeno di *Halobacteriovorax* nella depurazione dei molluschi bivalvi da *vibrio* patogeni, tale ceppo dovrà essere testato in prove di depurazione dapprima in un impianto sperimentale poi, a scala industriale. Ad oggi avendo svolto presso l'IZSUM, sede di Ancona, solo analisi preliminari molti sono i tasselli mancanti per esprimere un risultato certo e positivo riguardo i BALOs come purificatori biologici; tuttavia i dati raccolti ci fanno ben sperare per il futuro.

Qualora le analisi con i BALOs negli impianti di depurazione diano esiti positivi, sarà fondamentale analizzare poi diverse importanti questioni:

1. In primis il rapporto costo-beneficio, di questo metodo di depurazione biologica, ossia se il metodo di applicazione dei BALOs abbia dei costi compatibili per le aziende impegnate nell'allevamento e depurazione.
2. La standardizzazione dei protocolli operativi che forniscano informazioni dettagliate su come debbano essere impiegati i BALOs negli impianti e che permettano la riproducibilità del processo analitico.
3. La standardizzazione di protocolli operativi per la disinfezione degli impianti dai BALOs
4. La produzione su larga scala di BALOs certificati da mettere a disposizione delle Aziende per l'utilizzo negli impianti secondo i protocolli standardizzati.

CONCLUSIONI

La concentrazione di *Halobacteriovorax* e dei BALOs in generale, può cambiare nell'acqua di mare, in base alla stagionalità.

È possibile che durante il periodo invernale, i BALOs non siano presenti in acqua di mare perché possono concentrarsi nei sedimenti marini, oppure che la preda a basse temperature non riesca a sopravvivere e di conseguenza il predatore non riesca a moltiplicarsi.

I campioni positivi ai BALOs ottenuti in questo caso nei mesi in cui la temperatura dell'acqua superava i 15°C hanno confermato che il loro sviluppo non si sviluppa nei mesi invernali ed autunnali.

I risultati dimostrano che i BALOs contro *V. parahaemolyticus*, *E. coli* e *Salmonella spp.* sono presenti nella zona di raccolta dei molluschi bivalvi da noi campionata nell'Adriatico.

Questa sperimentazione rappresenta il punto di partenza con l'obiettivo finale di selezionare e caratterizzare BALOs idonei da utilizzare negli impianti di depurazione al fine di ottenere la sanificazione da batteri patogeni quali *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *Salmonella spp.*

Le attuali tecniche di depurazione dei molluschi bivalvi non sono efficaci nei confronti dei vibrioni per cui questa tesi sperimentale rappresenta il passo

iniziale per dimostrare come l'impiego dei BALOs possa essere una valida alternativa alle tecniche di purificazione.

Ad oggi avendo svolto presso l'IZSUM, sede di Ancona, solo analisi preliminari molti sono i tasselli mancanti per esprimere un risultato certo e positivo riguardo i BALOs come purificatori biologici; tuttavia i dati raccolti ci fanno ben sperare per il futuro.

Qualora le analisi con i BALOs negli impianti di depurazione diano esiti positivi, sarà fondamentale analizzare poi diverse importanti questioni:

1. In primis il rapporto costo-beneficio, di questo metodo di depurazione biologica, ossia se il metodo di applicazione dei BALOs abbia dei costi compatibili per le aziende impegnate nell'allevamento e depurazione.
2. La standardizzazione dei protocolli operativi che forniscano informazioni dettagliate su come debbano essere impiegati i BALOs negli impianti e che permettano la riproducibilità del processo analitico.
3. La standardizzazione di protocolli operativi per la disinfezione degli impianti dai BALOs
4. La produzione su larga scala di BALOs certificati da mettere a disposizione delle Aziende per l'utilizzo negli impianti secondo i protocolli standardizzati.

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento alla mia relatrice, la professoressa Francesca Biavasco, per la sua disponibilità e per la passione che mi ha trasmesso durante il mio percorso di studi.

Ringrazio la dottoressa Elena Rocchegiani e la dottoressa Donatella Ottaviani per avermi dato l'opportunità di frequentare il Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, per ricercare batteri sconosciuti e le loro caratteristiche innovative.

Ringrazio il dottor Gabriele Angelico per essere stato sempre presente, per l'impegno e per la disponibilità a fornirmi i procedimenti e tecniche di laboratorio per poter isolare e far crescere i BALOs.

Ringrazio la dottoressa Giulia Talevi e la dottoressa Sara Nardi per avermi insegnato il corretto funzionamento, la manutenzione degli strumenti e delle apparecchiature e il comportamento da adottare in un laboratorio di Microbiologia.

Ringrazio con affetto i miei genitori e mia sorella per avermi incoraggiato anche nei momenti difficili, permettendomi di raggiungere questo traguardo molto importante.

Ringrazio tutti i miei amici che mi sono stati vicino in questi anni.

BIBLIOGRAFIA

- Antonelli.G, Clementi.M, Pozzi G., Rossolini G.M, Principi di microbiologia medica.Casa editrice Ambrosiana, seconda edizione 2012; 2: 16-25; 18: 240-243.
- Atterbury, R. J., Hobley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., Fenton, A. K., Barrow, P. and Sockett, R. E. Effects of Orally Administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the Well-Being and Salmonella Colonization of Young Chicks. *Appl. Environ. Microb.* 2011;77: 5794-5803.
- Brindani F., Dottori M., Perini S., Merialdi G.,Bacci G. Predatory activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J towards food-borne Gram negative bacteria. 1: pathogenic microorganisms. *La Sezione Veterinaria* 1998, 2; 85-91.
- Brindani F., Dottori M., Perini S., Merialdi G.,Bacci G. Predatory activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J towards food-borne Gram negative bacteria. 2: Spoilage microorganisms . *La Sezione Veterinaria* 1998, 10; 783-788.
- Brock T. D., Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. *Spirilla*. . Brock Biology of microorganisms, Upper Saddle River, N.J. : Prentice Hall, 2005; 759-763.
- Carlone N. e Pompei R. . *Microbiologia Farmaceutica*. Casa editrice EdiSES, seconda edizione, 2014; 4: 39-48, 36: 421-424.
- Davidov, Y., Huchon, D., Koval, S. F. & Jurkevitch, E. A new aproteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environ. Microbiol.* , 2006; 8, 2179–2188.
- Diedrich, D. L.. *Bdellovibrios:recycling, remodelling and relocalizing components from their prey*. *Microbiol.* 1998; *Sci.* 5:100-103.

- Flannagan R. S., Valvano M. A., Koval S. F. Downregulation of the motA gene delays the escape of the obligate predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J from bdelloplasts of bacterial prey cells. *Microbiol.* ,2004; 150: 649-656.
- Fry J.C. and Staples D.G . Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976; 31(4): 469–474.
- Harini K., Ajila V., and Hegdel S. . *Bdellovibrio bacteriovorus* : A future antimicrobial agent?. *Indian Soc Periodontol.* 2013; 17(6): 823–825.
- Jackson L., Whiting R.C. .Reduction of an *Escherichia coli* K 12 population by *Bdellovibrio bacteriovorus* under various in vitro conditions of parasite: host ratio, temperature, or pH. *J. Food Prot.* 1992; 55: 859-861.
- Koval S.F., Hynes S.H., Flannagan R.S., Pasternak Z., Davidov Y., Jurkevitch E. *Bdellovibrio exovorus* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013;63:146–151.
- Koval S.F., Williams H.N., Stine O.C. . Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. nov., comb. nov. and *Bacteriovorax litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of *Halobacteriovoraceae* fam. nov. in the class Deltaproteobacteria. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015;65: 593-7.
- La Placa. *Principi di Microbiologia Medica*. Casa editrice: EdiSES quattordicesima edizione, 2014; 2: 67-80, 22:2277-281.
- Lee R., Lovatelli A., Ababouch L. . Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO Fisher. Tech. Paper* 2008; No. 511.

- Li H., Liu C., Chen L., Zhang X., Cai J. . Biological characterization of two marine Bdellovibrio-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster. *Int. J Food Microbiol.* 2011; 151(1):36-43.
- Li N., Williams H.N. .Pyrosequencing reveals diversity of Bdellovibrio and like organisms in fresh and salt water. *Antonie Van Leeuw.* . 2015; 107(1):305-11.
- Markelova N.O. .The Potential of Bdellovibrio For the Biocontrol of the Infectious Agent *Vibrio Cholerae*. *Avicenna J. Environ. Health Eng.* 2015;2(2):e4541.
- Morehouse K.A., Hobley L. , Capeness M., and Sockett R.E. Three motAB Stator Gene Products in Bdellovibrio bacteriovorus Contribute to Motility of a Single Flagellum during Predatory and Prey-Independent Growth. *J Bacteriol.* 2011; 193(4): 932–943.
- Núñez M., Martin M.O., Duong L.K., Ly E., and Spain E.M.. Investigations into the Life Cycle of the Bacterial Predator Bdellovibrio bacteriovorus 109J at an Interface by Atomic Force Microscopy. *Biophys J.* 2003; 84(5): 3379–3388.
- Ottaviani D., Chierichetti S., Leoni F. . Approccio biologico alla decontaminazione dei molluschi bivalvi da *V. parahaemolyticus* tramite Bdellovibrio e organismi similari (BALOs): Una collaborazione tra IZSUM e USDA-ARS. *Sanità Pubblica Veterinaria.* 2014;87.
- Ottaviani, D., Chierichetti, S., Angelico, G., Forte, C., Rocchegiani, E., Manuali, E., et al. (2018a). Halobacteriovorax isolated from marine water of the Adriatic sea, Italy, as an effective predator of *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1/O139 *V. cholerae*, *V. vulnificus*. *J. Appl. Microbiol.* 4, 1199–1207. doi: 10.1111/jam.14027

- Richards G.P., Watson M.A., Boyd E.F., Burkhardt W. III, Lau R., Uknalis J., and Fay J.P. . Seasonal Levels of the Vibrio Predator Bacteriovorax in Atlantic, Pacific, and Gulf Coast Seawater. *Int. J. of Microb.* Vol. 2013.
- Roszak D.B., Colwell R.R. . Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev.* 1987;51(3):365–79.
- Scherff, R.H. .Control of Bacterial Blight of Soybean by Bdellovibrio-bacteriovorus. *Phytopath.* 1973; 63, 400-402.
- Sockett R.E. .Predatory lifestyle of Bdellovibrio bacteriovorus. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63:523-39.
- Starr, M. P., and N. L. Baigent. Parasitic interaction of Bdellovibrio bacteriovorus with other bacteria. *J. Bacteriol.*1966; 91:2006-2017.
- Stolp, H. and Starr, M. P. .Bdellovibrio bacter-iovorur Gen. Et Sp. N., a Predatory, Ectoparasitic, and Bacteriolytic Microorganism. *Antonie Leeuw.* 1963; 29, 217-248.
- Stolp H. .Bdellovibrio bacteriovorus--ein räuberischer Bakterienparisit. *Naturwissenschaften.* 1968; 55(2):57–63.
- Varon M., Shilo M. .Interaction of Bdellovibrio bacteriovorus and hostbacteria. I. Kinetics studies of attachment and invasion of Escherichia coli B by Bdellovibrio bacteriovorus. *J. Bacteriol.* 1968; 95: 744-753.
- Weitz J.S., Stock C.A., Wilhelm S.W., Bourouiba L., Coleman M.L., Buchan A., Follows M.J., Fuhrman J.A., Jover L.F., Lennon J.T., Middelboe M., Sonderegger D.L, Suttle C.A., Taylor B.P., Frede Thingstad T., Wilson W..H, Wommack E. K. . A multitrophic model to quantify the effects of marine viruses on microbial food webs and ecosystem processes. *ISME J.* 2015;9(6):1352-64.

- Williams H.N., Lympelopoulou D.S., Athar R., Chauhan A., Dickerson T.L., Chen H., Laws E., Berhane T..K, Flowers A..R, Bradley N., Young S., Blackwood D., Murray J., Mustapha O., Blackwell C., Tung Y., Noble R.T. . Halobacteriovorax, an underestimated predator on bacteria: potential impact relative to viruses on bacterial mortality. ISME J. 2016;10(2):491-9.(A).
- Williams H.N., Lympelopoulou D.S., Athar R., Chauhan A., Dickerson T.L., Chen H., Laws E., Berhane T..K, Flowers A..R, Bradley N., Young S., Blackwood D., Murray J., Mustapha O., Blackwell C., Tung Y., Noble R.T. . Halobacteriovorax, an underestimated predator on bacteria: potential impact relative to viruses on bacterial mortality. Supplementary information. ISME J. 2016; 1-16.(B).