



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E  
DELL'AMBIENTE**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE  
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**CEPPI DI LIEVITI ISOLATI DAL MICROBIOTA DI INSETTI:  
STUDIO DELL'EVENTUALE NATURA PROBIOTICA**

**YEAST STRAINS ISOLATED FROM THE MICROBIOTA OF  
INSECTS: STUDY OF THEIR POSSIBLE PROBIOTIC FEATURE**

Tesi di Laurea Magistrale di

Moretti Laura

Relatore:

Prof.ssa Francesca Comitini

Correlatore:

Dr.ssa Alice Agarbati

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2021/2022

*Alla mia famiglia*

## Indice

Riassunto	1
Abstract	4
CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	7
1.1 Il microbiota dell'uomo	7
1.1.1 Sviluppo del microbiota intestinale	8
1.1.2 Composizione e funzioni	14
1.1.3 Microbiota e salute dell'uomo	24
1.2 I Probiotici	27
1.2.1 Probiotici, prebiotici e postbiotici	27
1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	32
1.2.3 Batteri e lieviti probiotici a confronto	34
1.3 Insetti e microbiota	37
1.3.1 Stabilità dell'intestino come habitat per i microrganismi	40
1.4 Interazione insetti-lieviti nel microbiota intestinale	43
1.4.1 Vantaggi dell'associazione tra lieviti e insetti	43
1.4.2 Applicazioni biotecnologiche	45
1.5 Mappatura del microbiota: tecniche di isolamento e caratterizzazione	48
CAPITOLO 2. SCOPO DELLA TESI	52
CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI	54
3.1 Terreni di coltura	54
3.1.1 Preparazione delle pre-colture	56
3.2 Simulazione delle condizioni chimiche del tratto gastro-intestinale	56
3.2.1 Sopravvivenza a 37°C e pH 2	57
3.2.2 Tolleranza alla pepsina	57
3.2.3 Tolleranza ai Sali biliari	58
3.3 Autoaggregazione	59
3.4 Idrofobicità della superficie cellulare	60

3.5 Inibizione di ceppi microbici patogeni	61
3.6 Capacità di adesione alla linea cellulare Caco-2	62
3.7 Safety analysis	65
3.7.1 Attività emolitica	65
3.7.2 Produzione di gelatinasi	66
3.7.3 Attività DNasica	66
3.8 Tipizzazione molecolare	66
3.8.1 Estrazione del DNA di lieviti non-Saccharomyces	67
3.8.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	68
3.8.3 Elettroforesi su gel d'agarosio	69
CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE	71
4.1 Risultati delle prove di simulazione delle condizioni chimico-fisiche del tratto gastro-intestinale umano	71
4.2 Risultati sulla capacità dei ceppi di lievito di aderire alla parete intestinale	83
4.3 Risultati prove di inibizione di batteri patogeni	85
4.4 Risultati prove adesione a cellule Caco-2	89
4.5 Risultati safety analysis	91
4.6 Risultati tipizzazione molecolare	94
CAPITOLO 5: CONCLUSIONI	100
BIBLIOGRAFIA	102

## Riassunto

Il termine “probiotico” deriva dall’unione della preposizione latina *pro-* (a favore di) e dell’aggettivo greco “βιωτικός” (biotico) derivante a sua volta dal sostantivo βίος (*bios*, vita). Nonostante, negli anni, il concetto di “probiotico” sia stato ampiamente discusso ed abusato dai non addetti ai lavori, ad oggi, la maggior parte dei ricercatori concordano con la definizione espressa nel documento del 2001 di FAO e OMS. Col termine probiotico si intendono “microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute” (FAO/WHO, 2001). Nell’uomo sono presenti circa  $10^{14}$  microrganismi, un ordine di grandezza in più rispetto al numero totale delle cellule che lo compone. Essi sono rappresentati principalmente da batteri, funghi, lieviti, archea e virus; abitano la cute, le mucose e tutto il tratto gastro-intestinale, dove, nel colon, i batteri arrivano a una concentrazione di  $10^{12}$  UFC/g (Jandhyala S.M. et al., 2015). L’elevata numerosità dei microrganismi è rispecchiata dalla miriade di funzioni che essi svolgono per l’ospite, con il quale instaurano una stretta simbiosi, che nel tempo si è evoluta e si è specializzata parallelamente alle abitudini dell’uomo. Questa popolazione viene definita con il termine “microbiota” e ad oggi è sempre più studiata per composizione, funzioni, attività ed effetti che la legano all’uomo in un rapporto reciproco.

A partire dal momento della nascita, la modalità del parto, l'allattamento e tutto il periodo dell'infanzia, rappresentano dei punti cardine nella prima determinazione della composizione del microbiota che a sua volta è strettamente correlata allo sviluppo del sistema nervoso del neonato. Non è da confondere però il microbiota come un elemento statico, anzi, dieta, stile di vita ed abitudini possono influire fortemente sulla sua composizione, esso stesso è estremamente dinamico, si adatta alle condizioni esterne ed interne dell'ambiente di vita ed è in grado di mutare in modo transiente o stabile, nel core o superficialmente e produrre effetti molto diversi, dando vita a una stretta simbiosi tra uomo e microrganismi, descritta dal termine "olobionte" (Milano C. et al., 2017), in cui, senza l'uno, non potrebbe vivere l'altro.

Se da un lato il microbiota contribuisce alla proliferazione delle cellule intestinali e la loro differenziazione, al controllo dell'equilibrio energetico del corpo e del pH, allo sviluppo del sistema immunitario e alla protezione contro i patogeni, dall'altra l'uomo fornisce un ambiente adeguato ai microrganismi che diventano capaci di colonizzare, nonché i nutrienti necessari.

Alla luce dei numerosi studi (Elizabeth T et al., 2017) sul microbiota e su come questo possa incidere fortemente sullo stato di salute dell'individuo, si cercano continuamente nuove specie di microrganismi, al fine di ampliare le conoscenze su questo piccolo grande mondo e sfruttarne a pieno le potenzialità.

Il presente lavoro di ricerca si pone l'obiettivo di isolare e testare nuovi potenziali ceppi probiotici per l'uomo utilizzando come fonte di isolamento l'intestino degli insetti. In particolare nell'associazione tra insetti e microbiota è sorprendente come in molti casi siano i lieviti che abitano il *core* del microbiota a svolgere ruoli fondamentali, come ad esempio stimolare l'ovideposizione e lo sviluppo della larva in *Drosophila melanogaster* o l'effetto immunomodulatore in *Apis mellifera*.

Per questi motivi e sulla base delle caratteristiche che differenziano i lieviti dai batteri come l'incapacità di acquisire geni di antibiotico-resistenza ed essere immuni all'azione degli antibiotici, si è scelto di ricercare le caratteristiche probiotiche esclusivamente nella popolazione lievitifforme, consapevoli del grande potenziale in gran parte ancora inesplorato.

In particolare, sono stati isolati dall'intestino delle api (*Apis mellifera*) oltre cento lieviti, da ambienti di vita e loro prodotti, sono stati testati *in vitro*, in accordo alle linee guida dell'OMS, per le caratteristiche probiotiche: resistenza all'ambiente fisico-chimico del tratto digerente, inibizione dei patogeni, capacità di aderire alle cellule intestinali e prove sulla sicurezza.

I risultati di questo studio pongono le basi per ulteriori studi *in vivo*.

## **Abstract**

The term "probiotic" is composed from the Latin preposition pro- and the Greek adjective "βιωτικός" (biotic), which derives from the word βίος (bios, life). As years go by, the concept of "probiotics" has been discussed. Currently, most researchers agree with the definition from the official documents in 2001 from FAO and WHO that define probiotics as "live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a significant health benefit on the host" (FAO/WHO, 2001). In the human body there are many microorganisms represented by bacteria, fungi, yeasts, archaea and viruses. They live on the skin, mucosa and intestine where, particularly in the colon, the number of bacteria reach  $10^{12}$  UFC/g. The high number of microorganisms is reflected by the myriad of functions they perform for the host, with whom they establish a close symbiosis, which over time has evolved and specialized in parallel with human's habits. Such organisms are called "microbiota". From the moment of birth, modalities of childbirth, breastfeeding and infancy are the central moments for determining microbiota composition that affects the development of the nervous system of a newborn. Microbiota is not a static element; instead, diet, lifestyle and habits can strongly affect its composition. It is incredibly dynamic, it can adapt to external and internal conditions of the human body, and it can change over time transiently or stably, in the core or superficially,



and it can cause various effects. The relationship between microorganisms and human is a symbiosis; specifically, we can define it as "holobiont" (Milano C. et al., 2017), which means that two different species cohabit and cooperate.

Symbiosis is formed from two parts: one is the microbiota, which contributes to intestinal cells proliferation and differentiation, control of energetic metabolism and pH of the body, proliferation of immune system and protection against pathogens, and the other one is the human, which gives a safe place to colonize and the necessary nutrients.

Given all studies about microbiota and how it can affect an individual's health, we constantly search for new possibilities to increase our knowledge about this little big world and exploit all the potential.

This research aims to find and test new potential probiotic strains for the human from the intestine of the insects, which, like humans, have different chemical and physical conditions inside their gastrointestinal tract, so they are stimulating sources of isolation to study.

Seeing the association between insects and microbiota, yeasts play a fundamental role in most scenarios. For example, yeasts stimulate oviposition and larvae development in *Drosophila melanogaster* or have an immunomodulatory effect in *Apis mellifera*.

For these reasons and based on the characteristics that differentiate yeasts from bacteria such as the inability to acquire antibiotic-resistance genes and be immune to the action of antibiotics, it was decided to search for probiotic characteristics exclusively in the yeast-like population, aware of the great largely unexplored potential.

Specifically, yeasts were isolated from the intestine of honeybees (*Apis mellifera*), their environments and products. Yeasts were tested *in vitro*, according to WHO guidelines, for probiotic proprieties: resistance to the physical-chemical environment of the digestive tract, inhibition of pathogens, ability di adhere to intestinal cells and safety analysis.

The results of this study would represent the basis for other *in vivo* studies.

# **CAPITOLO 1. INTRODUZIONE**

## **1.1 Il microbiota dell'uomo**

Il'ja Il'ič Mečnikov, fu un biologo e immunologo russo, il primo, nel 1901, ad ipotizzare e a studiare la presenza di microrganismi utili all'interno del nostro organismo. Grazie agli studi di Mečnikov nasce l'idea che i batteri lattici, lungi dall'essere patogeni, svolgono un ruolo importante per il nostro benessere.

A poco a poco gli studi progredirono e aumentò la comprensione su come il microbiota intervenga nell'assimilazione di vitamine e sostanze nutritive, il suo ruolo a livello immunitario e molto altro.

Negli anni '90 si comprese come il sistema gastrointestinale fosse diretto da un "secondo cervello", il sistema nervoso enterico e ciò avvalorò l'ipotesi dell'importanza della flora intestinale.

La svolta decisiva partì dal 2006, momento in cui, grazie ai progressi compiuti nelle tecniche di sequenziamento, si iniziò a decodificare il genoma batterico, il microbioma, ed ad analizzare le specie, prima sconosciute a causa dell'impossibilità di coltivarle su un mezzo di crescita, del microbiota intestinale.

Nonostante l'avanzamento delle ricerche sul tema, la maggior parte degli studi scientifici pubblicati riguardano i batteri e quasi nulla si conosce sui lieviti,

probabilmente perché rappresentano solo una piccola parte del microbiota, il che li rende difficili da isolare e studiare.

Ad oggi le ricerche in merito di lieviti probiotici sono sempre più numerose e complesse, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* è stato il primo ed unico lievito, ad oggi, ad essere commercializzato. *S. boulardii* fu isolato per la prima volta dal frutto della pianta *Litchi chinensis* in Indocina, usato in Francia per il trattamento della diarrea negli anni '50 e fu messo in commercio nel 1962 dall'azienda farmaceutica Laboratoires Biocodex (Montrouge, France) in forma liofilizzata (McFarland L.V. et al., 1993).

Attualmente molte altre specie di lieviti sono in fase di studio per le potenzialità probiotiche tra cui *Pichia fermentans* BY5, *Pichia kudriavzevii* BY10, *Pichia kudriavzevii* BY15 e *Yarrowia lipolytica* HY4 per il loro ruolo nella riduzione dei livelli di colesterolo nel sangue (Chen L.S. et al., 2010).

### **1.1.1 Sviluppo del microbiota intestinale**

Lo sviluppo del microbiota gastro-intestinale (GI) dell'uomo sembra avere inizio già dal periodo di gestazione. Alcuni studi, anche se limitati, hanno evidenziato una possibile interazione tra la madre e il feto grazie alla mediazione di microrganismi e la presenza di quest'ultimi nei tessuti dell'utero

come la placenta; un'ipotesi molto più probabile è che il contributo nello sviluppo del sistema immunitario del feto sia fornito non dai microrganismi in sé, ma dai loro metaboliti.

Mentre le interazioni con i microrganismi durante il periodo di gestazione è un argomento nuovo, al contrario, il momento della nascita è stato ampiamente studiato e rappresenta un momento fondamentale per la prima costituzione del microbiota.

La modalità del parto rappresenta una delle prime variabili che influenzano la colonizzazione delle mucose e del tratto GI del neonato. Nel parto vaginale il neonato entra in contatto con la flora vaginale, ricca dei generi *Lactobacilli*, *Prevotella* o *Sneathia spp.* ed acquisisce un microbiota molto variegato. Di contro, il parto cesareo sembrerebbe impoverire l'elevata diversità e favorire la prevalenza di alcuni batteri come *Escherichia coli* e *Clostridium difficile*, potenzialmente nocivi, e lo sviluppo di malattie dell'intestino e di altre non strettamente correlate ad esso come, per esempio, le allergie. La differenza tra microbiota di individui nati da parto cesareo o vaginale persiste anche in età adulta, com'è stato rilevato dall'analisi di campioni fecali (Istituto Superiore di Sanità, ISS).

Differenze significative sono state osservate anche per la composizione del microbiota di bambini nati pre-termine e quelli nati entro il termine di

gravidanza, i primi mancano dei ceppi normalmente dominanti *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, compensati dall'aumento di *Proteobacteria*.

È interessante notare poi come la composizione microbica del tratto GI sia strettamente connessa alle esigenze nutrizionali, solo nei bambini allattati al seno si rileva un aumento di specie *Bifidobacterium* che evolvono in concomitanza all'assunzione di oligosaccaridi del latte umano (HMOs). Il momento dell'allattamento è quindi un altro punto fondamentale per l'evoluzione delle specie del microbiota e per lo sviluppo del sistema immunitario.

Nelle prime fasi di sviluppo il microbiota è generalmente a bassa diversità ed è dominato da due phyla principali, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*, per poi evolvere e raggiungere una complessità più simile a quella adulta ad un anno dalla nascita.

In ogni caso, è ormai sempre più evidente che il periodo neonatale e i primi anni di vita rappresentano un momento critico per le potenziali implicazioni a lungo termine sulla salute e la comparsa di alcuni tipi di malattie (Dinan et al.,2016)

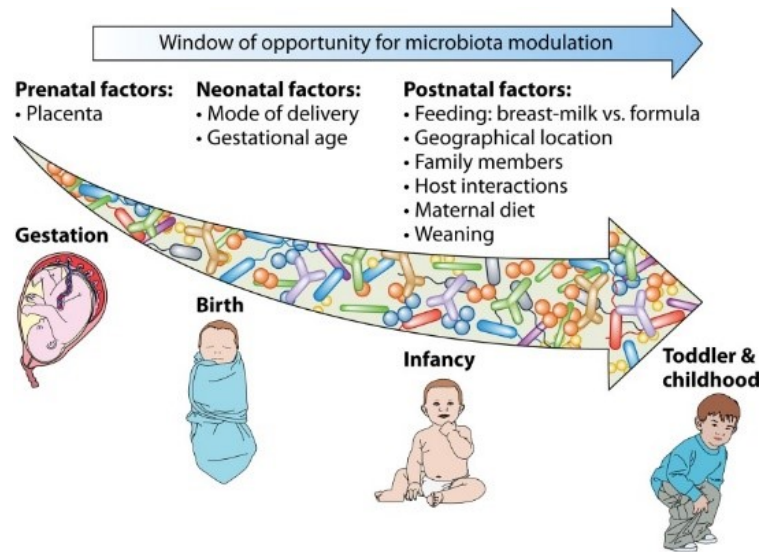


Figura 1. Fattori che modificano il microbiota dalla gestazione all'adolescenza (Dinan et al., 2016)

In età adulta la composizione del microbiota è relativamente stabile ma è comunque altamente dinamica in funzione degli agenti esterni. Infezioni, malattie, dieta e antibiotici sono tra i molti fattori che possono alterare l'equilibrio del microbiota, ma è anche vero che, nel momento in cui l'elemento alterativo viene eliminato, l'organismo è in grado di ristabilire l'equilibrio e tornare ai precedenti livelli di diversità.

Uno dei fattori più importanti nel modellamento del microbiota è rappresentato dalla dieta, in base al tipo di alimentazione, carnivora, onnivora, vegetariana o vegana, variano le abbondanze delle specie batteriche intestinali. In uno studio è stata presa in considerazione una popolazione di individui sottoposta per un periodo di tempo a un'alimentazione ricca di fibre, è stato visto come nel giro di 3-4 giorni c'è stato un aumento forte e correlabile di alcune specie batteriche,

in grado di digerire polisaccaridi non digeribili dall'organismo, a livello intestinale (Walker A. et al., 2011)

Comparando ad esempio persone con tipo di alimentazione diversa vediamo come il microbiota cambia radicalmente fra loro. Ciò che noi mangiamo è ciò che mangia il nostro microbiota, se mangiamo principalmente carboidrati saranno preponderanti i microrganismi che si nutrono di carboidrati. In questa visione è importante quindi avere un'alimentazione varia per avere il microbiota il più diversificato possibile.

Oltre la dieta sono tanti i fattori che portano a cambiamenti della composizione specifica del microbiota GI come la variabilità interindividuale che dipende dal genere, provenienza, genetica, ma anche stile di vita, ambiente di vita e abitudini. I cambiamenti possono avvenire anche nell'arco di una singola giornata per più del 60% della composizione, ma possono interferire anche sul lungo termine a causa, ad esempio, dell'assunzione prolungata nel tempo di antibiotici e portare quindi a modificazioni strutturali della popolazione.

Una delle prime caratteristiche descritte dell'effetto degli antibiotici sull'intestino è stata la perdita della resistenza alla colonizzazione. Sia la competizione per le risorse che la competizione per interferenza diretta giocano un ruolo nella resistenza del microbiota sano alla colonizzazione da parte di agenti patogeni; gli antibiotici rompono questo equilibrio, le barriere si



sfaldano ed è più semplice la penetrazione di microrganismi patogeni come *Salmonella typhimurium* e *C. difficile*. In base al tipo di antibiotico utilizzato gli effetti sull'organismo possono essere più o meno estesi e duraturi, è stato osservato, ad esempio, che gli antibiotici contro i batteri anaerobi sono quelli che causano gli effetti più duraturi nel tempo sulla composizione microbica. Mentre in alcuni casi l'equilibrio può essere completamente ristabilito, in altri ciò avviene solo parzialmente e nei casi più gravi può essere del tutto danneggiato.

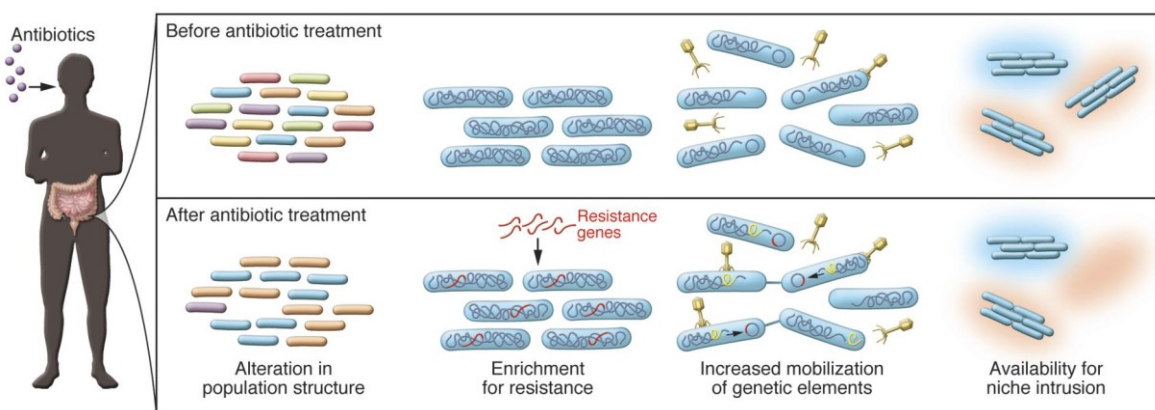


Figura 2. Effetti degli antibiotici sul microbiota (Modi SR et al., 2014)

Nel contrastare le infezioni da *C. difficile* è stato osservato come i lieviti appartenenti alle specie *S. cerevisiae* e *S. boulardii*, isolati dall'intestino umano, abbiano un ruolo difensivo importante.

Infine, non per importanza, un altro momento cruciale nelle modificazioni del microbiota è stato osservato dopo i 65 anni, in cui inizia ad impoverirsi di *Bifidobacteria*, a conferma di quanto sia importante il mantenimento della

diversità di specie del microbiota, in relazione alla riduzione della progressione di malattie neurodegenerative (Dinan et al., 2016).

In sintesi, il microbiota è fortemente influenzato da:

- modalità del parto
- dieta durante l'infanzia: latte materno o latte artificiale
- dieta in età adulta: vegana, vegetariana, onnivora
- uso di antibiotici o di molecole ad azione antibiotica che derivano dall'ambiente o dai commensali del tratto GI

ma può essere continuamente modificato dalla dieta, in cui carboidrati e proteine hanno un ruolo fondamentale nella sua diversificazione, e da fattori ambientali, l'uso ridotto o prolungato di antibiotici può essere determinante per le sue modificazioni transienti o stabili nel tempo.

### **1.1.2 Composizione e funzioni**

Si stima che, in ogni individuo, per ogni cellula umana siano presenti almeno 5 cellule di microrganismi, per un ammontare, solo nell'intestino, di  $10^{13}$ – $10^{14}$  microrganismi. In termini di geni ne abbiamo una quantità 100 volte maggiore nel microbioma rispetto che nel nostro genoma, tanto da poter ipotizzare che molte delle nostre funzioni siano associate al genoma di questi microrganismi (Dinan et al., 2016). Circa il 70% dei microrganismi risiede

nell'intestino, in particolare nel colon, mentre la restante parte colonizza tutte quelle superfici esposte all'ambiente esterno: mucose, cute, ecc..

Nel tratto GI la densità e la composizione del microbiota varia in funzione di gradienti chimici, nutrizionali e immunologici in esso presenti. Nell'intestino tenue sono presenti generalmente elevati livelli di acidi, ossigeno e antimicrobici ed è caratterizzato da un breve periodo di transito, ciò limita la crescita batterica favorendo la sopravvivenza solo di anaerobi facoltativi a crescita rapida con l'abilità di aderire all'epitelio o la mucosa. Al contrario le condizioni presenti nel colon supportano lo sviluppo di una densa e diversificata comunità batterica, principalmente anaerobi con la capacità di utilizzare i carboidrati che non stati digeriti. Nel colon dominano i generi *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae* e *Rikenellaceae*.

I ricercatori misurano lo stato di salute del microbiota tenendo conto di tre fattori:

- ricchezza della diversità delle specie di microbi presenti
- abbondanza numerica relativa di ogni specie
- rapporto tra specie benefiche e quelle potenzialmente dannose (se sono più numerose le une rispetto alle altre)

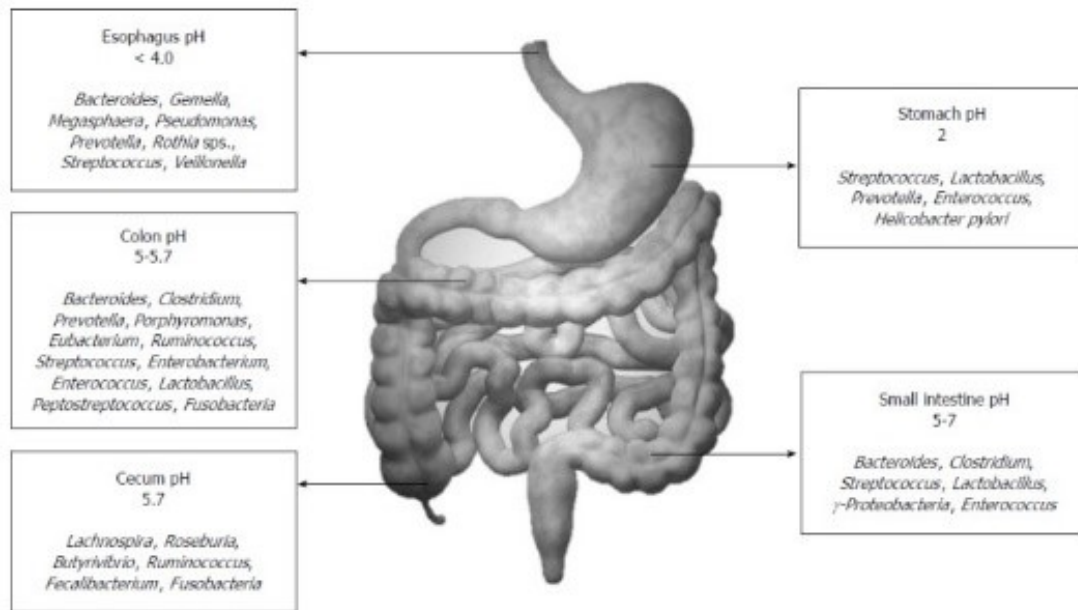


Figura 3. Distribuzione dei ceppi microbici lungo il tratto gastro-intestinale (Jandhyala SM et al., 2015)

La composizione è estremamente variabile in base all'individuo ma possiamo distinguere delle macrocategorie:

- 55% batteri: in cui dominano i generi *Bacteroidetes* e *Firmicutes* e meno rappresentati i generi *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*
- 20% eucarioti: soprattutto funghi e lieviti tra i generi: *Candida*, *Malassezia*
- 15% archea
- 10% virus

Di tutto ciò è noto solo il 5%, una percentuale piccolissima rispetto il grande potenziale che racchiude questo mondo.

È stata suggerita la presenza di un core del microbiota proposto come un insieme dei microrganismi dominanti presenti in tutti gli individui. Sulla base della composizione di questo “core” è possibile fare una distinzione in 3 gruppi definiti “enterotipi”. Ogni enterotipo presenta una variazione importante in uno dei tre generi: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) e *Ruminococcus* (enterotipo 3).

Ancora non è ben chiaro se uno specifico enterotipo sia associato ad un determinato stato di salute dell’individuo, ma da alcuni studi è emerso che nei malati di cancro che possiedono uno dei tre enterotipi, una certa terapia può risultare più efficace rispetto che negli altri (Arumugam M et al., 2011).

Dagli studi pubblicati si conosce che i lieviti sinora isolati dall’uomo (“microbioma”) comprendono 158 generi e 390 specie di cui almeno 221 si trovano solamente nel tratto digerente. Tra i generi più frequentemente riscontrati nel tratto GI troviamo: *Candida*, *Malassezia*, *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Galactomyces*, *Saccharomyces* e *Cryptococcus*, la composizione del microbiota è però molto più instabile e variabile a livello interindividuale rispetto il microbiota e ciò rende più difficoltoso definire la sua precisa composizione nell’uomo. (Basmacıyan L. et al., 2019).

In ogni caso gli studi sui lieviti del microbiota sono ancora poco approfonditi, alcune ricerche evidenziano il loro ruolo nella funzione digestiva, altre

comparano la biodiversità ed evidenziano le differenze del microbioma tra persone sane e persone con obesità o IBD, ma tutte devono essere ulteriormente investigate per poter comprendere al meglio le funzioni che questo piccolo mondo svolge in simbiosi con il nostro organismo. (Basmacıyan L. et al., 2019).

Molti lieviti trovati nell'intestino non sono autoctoni ma provenienti da alimenti o dall'ambiente, ne sono un esempio i lieviti della famiglia *Dipodascaceae*, di origine ambientale, o *Saccharomyces cerevisiae*, proveniente dai prodotti da forno. *S. cerevisiae* non è un vero commensale dell'intestino ma il fatto che sia in grado di sopravvivere a 37°C e che venga frequentemente ingerito attraverso il consumo di prodotti da forno, lo rende uno dei lieviti più comunemente rilevati nei campioni fecali e molto probabilmente contribuisce all'ecologia microbica dell'intestino. (Hallen-Adams H.E. et al., 2017)

L'elevata variabilità che caratterizza il microbiota, sia batteri che lieviti, è rispecchiata dalle funzioni che esso svolge per l'ospite, nonostante non siano completamente note proprio per la complessa rete di interazioni che stabiliscono con l'organismo, sono molte e variegata (Jandhyala SM et al, 2015).

- Metabolismo dei nutrienti nell'ospite

La funzione più conosciuta del microbiota è quella della digestione. Uno studio ha messo a confronto topi privati del microbiota intestinale con topi normali, scoprendo che i primi necessitavano di ingerire il cibo in quantità 5 volte maggiori in quanto molte sostanze non potevano essere digerite perché assenti gli enzimi del microbiota.

La maggior parte dei nutrienti del microbiota GI derivano dai carboidrati alimentari. La fermentazione dei carboidrati da parte di *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium*, e *Enterobacteria* porta alla produzione di acidi grassi a catena corta (SCFAs) come il butirrato, propionato e acetato. Gli SCFAs sono noti per i molteplici effetti positivi sull'organismo: aumentano la produzione intestinale di glucosio e inibiscono l'attività di enzimi coinvolti in una serie di disturbi neuropsichiatrici tra cui depressione, schizofrenie e malattia di Alzheimer; possono inoltre modulare la neuroinfiammazione, influenzare il sistema immunitario e stimolare il rilascio di ormoni intestinali, insulina e leptina.

Nel metabolismo lipidico i microrganismi possono indurre la soppressione dell'inibizione della lipoproteina lipasi negli adipociti, mentre nel metabolismo proteico svolgono la loro azione attraverso la produzione delle proteinasi microbiche e le peptidasi in tandem con le proteinasi umane.

Sulla parete batterica sono presenti trasportatori di aminoacidi (aa) che mediano l'entrata degli aa nella cellula batterica dove vengono trasformate in piccole molecole segnale e peptidi antimicrobici (batteriocine). Un esempio importante è rappresentato dalla conversione dell' L-istidina in istamina attraverso l'enzima batterico istamina decarbossilasi.

Alcuni ceppi batterici contribuiscono inoltre alla sintesi della vitamina K e delle vitamine del gruppo B, rappresentando una fonte naturale per l'arricchimento di alimenti fermentati/funzionali, danno valore aggiunto al prodotto e contemporaneamente abbattano i costi di produzione (LeBlanc JG et al., 2013)

Membri del genere *Bacteroides* hanno mostrato la capacità di produrre acido linoleico coniugato, noto per essere antidiabetico, antiaterogenico, anti-obesogenico, ipolipidemizzante e con proprietà immunomodulatorie.

Recenti studi hanno evidenziato come il microbiota GI umano sia coinvolto anche nella degradazione di diversi polifenoli che derivano dalla dieta e quindi nella formazione di metaboliti secondari come flavonoli, flavononi, antocianidine, isoflavoni, ecc... con azione antimicrobica e altre azioni metaboliche.



- Metabolismo xenobiotici e farmaci

Un esempio interessante è rappresentato dalla produzione della beta-glucuronidasi microbica che media la deconiugazione del farmaco antitumorale ‘irinotecan’ che, con la sua tossicità, può causare fenomeni di diarrea, infiammazione e anoressia.

- Mantenimento dell’integrità della barriera intestinale e della struttura del tratto gastrointestinale

Numerosi studi confermano il ruolo del microbiota intestinale nel mantenimento della sua struttura e funzionalità del tratto GI. Ad esempio, *Bacteroides thetaiotaomicron* induce l’espressione della proteina prolin-rich 2A (spr2A) necessaria per il mantenimento dei desmosomi nei villi intestinali. Importanti evidenze sono frutto di studi su topi privati del microbiota intestinale, definiti germ-free (GF), essi presentavano una minore superficie intestinale, villi sottili, un aumento del tempo necessario per il ciclo cellulare e una peristalsi alterata. Da questi studi è inoltre emerso che il microbiota intestinale, stimolando la produzione del fattore di trascrizione angiogenina-3, induce lo sviluppo della struttura microvascolare intestinale.

- Immunomodulazione

Il microbiota intestinale partecipa alla regolazione delle risposte immunitarie dell’organismo, in cooperazione sia con il sistema immunitario innato che

adattativo. I microrganismi comunicano con una grande varietà di cellule immunitarie tra cui: tessuto linfoide associato all'intestino (GALT), linfociti T, plasmacellule che producono IgA, cellule linfoide innate del gruppo 3 e macrofagi e dendriti residenti nella lamina propria.

- Protezione contro i patogeni

L'azione del sistema immunitario della mucosa intestinale si divide in due, da una parte deve essere tollerante nei confronti dei commensali benefici, ma dall'altra deve prevenire la crescita eccessiva dei patogeni residenti.

Uno dei meccanismi più semplici nella protezione antimicrobica nell'intestino crasso è rappresentato da una barriera formata da un doppio strato di muco, uno strato più interno e più denso privo di microrganismi e uno più esterno, contenente glicani, fonte di nutrimento per i microrganismi, che separa i microbi dal contatto con l'epitelio. Al contrario, nell'intestino tenue, l'attività antimicrobica è svolta principalmente da proteine antimicrobiche, come le catelicidine, la cui sintesi è stimolata dal microbiota GI.

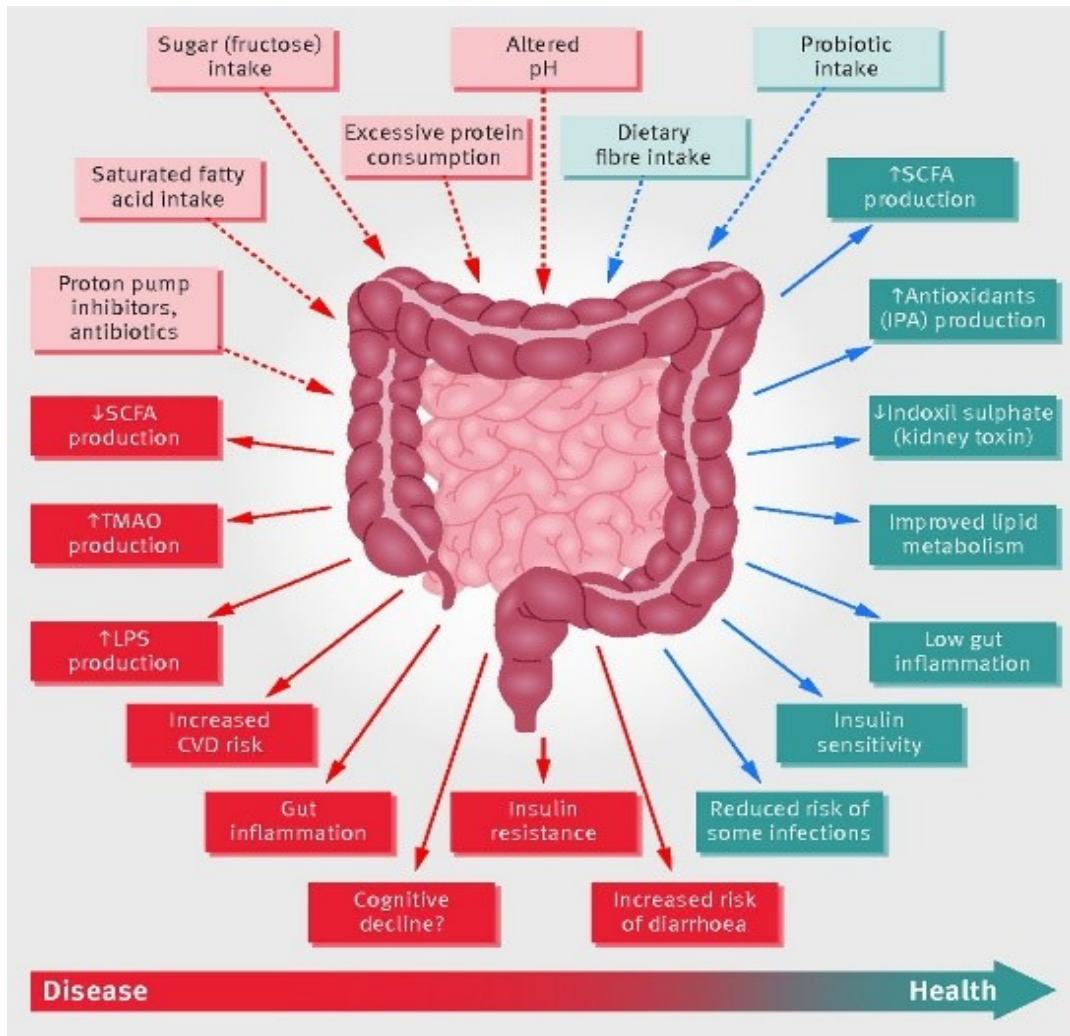


Figura 4. Ruoli del microbiota nel tratto gastro-intestinale (Jandhyala SM et al., 2015). In rosso sono rappresentati gli effetti di una disbiosi a livello intestinale, mentre in azzurro gli effetti di un microbiota equilibrato.

### **1.1.3 Microbiota e salute dell'uomo**

La grande popolazione del microbiota vede al suo interno tante classi di attori, tra questi troviamo:

- patobionti: chiamati così in quanto potenzialmente patogeni per l'ospite, nonostante le interazioni siano costanti e molto dinamiche, essi interagiscono solo indirettamente con il sistema immunitario.

A livello intestinale i patobionti agiscono degradando il muco, fonte di carbonio, e interagendo intimamente con la mucosa intestinale, queste due attività stimolano il mantenimento della barriera intestinale e la risposta del sistema immunitario, educandolo ad una pronta risposta nei confronti di futuri patogeni (Hornef M., 2015).

- simbionti, sono i commensali del nostro tratto GI, svolgono tra le più svariate funzioni, tra cui la sintesi di nutrienti essenziali come le vitamine ed a contribuire allo sviluppo del sistema immunitario della mucosa intestinale. I simbionti sono, inoltre, in grado di competere e impedire la colonizzazione di patogeni nella prima fase dell'infezione, tanto che molte delle specie normalmente commensali fanno parte dei microrganismi usati come probiotici. Sia i patobionti che i simbionti sono utili al nostro organismo in quanto i primi sono importanti per stabilire un'immunità nei confronti dei patogeni, fanno una sorta di training all'organismo, lo preparano per affrontare i futuri patogeni;

mentre i simbionti spingono il sistema immunitario verso una sorta di tolleranza sia nei confronti del microbiota che nei confronti del cibo. Molto spesso, ad esempio, quando si sviluppano intolleranze alimentari è perché sono associate ad una alternazione dell'equilibrio tra patobionti e simbionti, che prende il nome di disbiosi.

La disbiosi è una condizione di alterazione della flora batterica fisiologica, associata spesso sia a problematiche a livello intestinale come malattie infiammatorie dell'intestino, sindrome del colon irritabile (IBS) e celiachia, sia a livello extra-intestinale come asma, allergie, sindrome metabolica, malattie cardiovascolari e obesità. Molto spesso i meccanismi che portano allo sviluppo di queste patologie sono correlati a delle alterazioni delle relazioni normalmente presenti tra il microbiota del colon, i suoi prodotti metabolici e il sistema immunitario dell'ospite.

Tra le svariate funzioni che il microbiota svolge all'interno dell'organismo, è interessante scoprire come si inserisce nel processo di carcinogenesi.

Molti fattori possono facilitare lo sviluppo di tumori in persone a rischio, tra cui la genetica, i fattori ambientali, la dieta e lo stile di vita, ma questi stessi fattori, a loro volta, incidono anche sulla composizione del microbiota. Sulla base di queste correlazioni sono stati fatti molti studi per comprendere come il processo di tumorigenesi e il microbiota possano influenzarsi a vicenda.

In condizioni fisiologiche i batteri sono più abbondanti nell'ileo terminale e nel colon, dove sono inglobati in uno strato di muco che li separa fisicamente dal lume intestinale. In condizioni patologiche, come durante lo sviluppo di tumore al colon retto, la differenziazione delle cellule, tipica del processo di carcinogenesi, modifica la loro capacità di produrre muco e ciò fa sì che i batteri, non più inglobati nel muco, si disperdano nel lume intestinale ed interagiscano, attraverso la produzione di genotossine, con le cellule tumorali, facilitando la tumorigenesi o alterando la risposta infiammatoria (Garrett W.S., 2015). L'influenza dei batteri sullo sviluppo del tumore non è limitata solo al colon-retto, ma la loro presenza è stata riscontrata anche in organi lontani dal tratto GI come la mammella e i polmoni (Nejman D. et al., 2020).

Non tutti i microrganismi del microambiente tumorali sono di tipo pro-infiammatori, studi su animali, poi confermati anche sull'uomo, hanno dimostrato che durante la progressione del tumore, alcuni ceppi batterici venivano persi totalmente, gli stessi ceppi sono poi stati somministrati all'individuo, producendo effetti anti-infiammatori. Da tutto ciò possiamo dedurre che lo sviluppo del tumore può essere correlato o ad un aumento dei microrganismi pro-infiammatori o ad una diminuzione degli anti-infiammatori o entrambi.

## **1.2 I Probiotici**

### **1.2.1 Probiotici, prebiotici e postbiotici**

#### Definizione

Le linee guida del 2001 di FAO e OMS definiscono i probiotici come “microrganismi vivi che si dimostrano in grado, una volta somministrati in adeguate quantità, di apportare un beneficio alla salute dell’ospite”.

Microrganismi vitali possono essere presenti in molti alimenti e bevande fermentate, come, ad esempio, il the kombucha, sauerkraut e kimchi, ma solo i ceppi i cui effetti sulla salute sono stati scientificamente dimostrati possono essere definiti probiotici.

Ogni probiotico viene definito per genere, specie e ceppo, la caratterizzazione molecolare è importante in quanto differenti ceppi della stessa specie possono avere effetti diversi sulla salute. Altrettanto fondamentale è la concentrazione con cui viene ingerito il probiotico, se consumato in eccesso o in difetto in entrambi i casi potrebbe non avere effetti benefici, la dose ottimale viene valutata e stabilita in base alle evidenze scientifiche.

In quanto sono necessari microrganismi vitali e biologicamente attivi nel sito bersaglio dell'ospite, i microrganismi probiotici devono essere in grado di resistere alle barriere naturali del tratto GI contro i microrganismi ingeriti. Le

linee guida redatte dall'OMS forniscono una serie di caratteristiche che il probiotico deve avere per essere definito tale e sono:

- resistenza all'aggressione dei succhi gastrici e della bile e quindi deve essere in grado di sopravvivere anche nell'ambiente acido dello stomaco;
- aderire fermamente alla mucosa, colonizzarla e restare vitale a livello intestinale;
- essere identificato per quanto riguarda il ceppo e definita la concentrazione di batteri vivi;
- essere ben definito per quanto riguarda la dose efficace e le indicazioni terapeutiche, che devono essere supportate da evidenze scientifiche;
- essere riconosciuto dall'organismo ospite, cioè essere normalmente costituente della flora dell'intestino sano ed essere privo di effetti collaterali anche in pazienti immunodepressi.

Sulla base di queste caratteristiche sono stati selezionati ceppi di microrganismi molto diversi tra loro per quanto riguarda gli effetti probiotici sull'organismo che sono molteplici e molto diversificati, come: il riequilibrio della flora batterica intestinale, il controllo della diarrea associata all'assunzione di antibiotici o della gastrite da *Helicobacter pylori*, il potenziamento del sistema immunitario, cura della infiammazioni del tratto GI come la sindrome del colon irritabile e l'intolleranza al lattosio. Un numero sempre maggiore di studi,



inoltre, confermano il contributo dei probiotici al miglioramento della salute, non solo nel tratto digestivo, ma anche nel cavo orale, lingua, pelle, tratto vaginale e urinario.

I probiotici oggi in commercio hanno superato i test di sicurezza sulla salute, ma per alcune categorie a rischio come i neonati prematuri, individui immunocompromessi o con patologie severe sono necessarie alcune precauzioni sulla loro assunzione (Sanders ME et al., 2016).

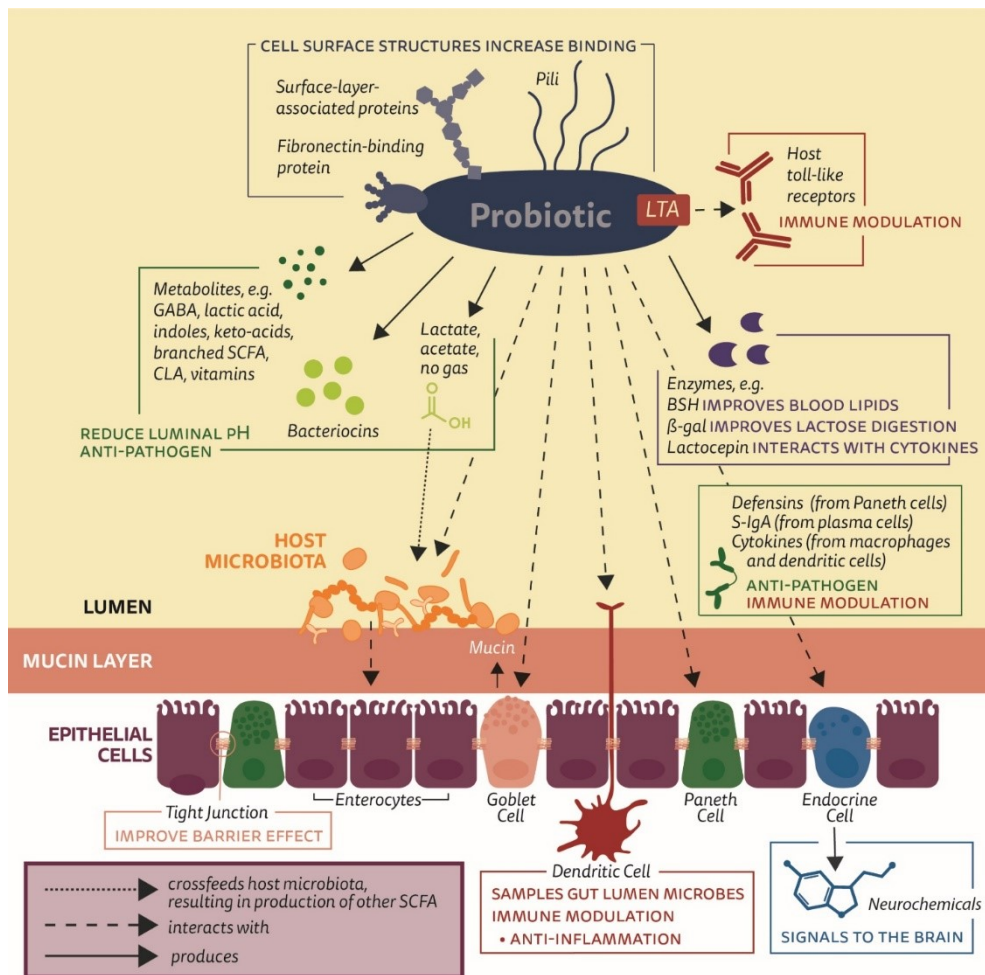


Figura 5. Ruoli dei probiotici nell'organismo umano (ISAAP)

La maggior parte dei probiotici in commercio sono batteri, tra questi le specie ampiamente studiate ed anche le più usate sono *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhammosus*, più in generale i prodotti contenenti probiotici contengono solitamente batteri dei generi *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium* e alcuni batteri non lattici. Meno comuni, ma comunque molto studiati, sono anche altri batteri come *Enterococcus faecium* e *Propionibacterium spp.* e il lievito *Saccharomyces boulardii*, l'unico lievito sul mercato, con il nome commerciale di "Codex", appartenente alla categoria dei microrganismi antidiarroici (Marangoni F.).

Il termine "prebiotici" è stato introdotto per la prima volta nel 1995 in uno studio di Gibson e Roberfroid, ampiamente discusso e dibattuto, oggi l'OMS lo definisce come "sostanze non digeribili di origine alimentare che, assunte in quantità adeguata, favoriscono selettivamente la crescita e l'attività di uno o più microrganismi già presenti nel tratto intestinale o assunti insieme al prebiotico".

Lo scopo dei prebiotici, così come per i probiotici, è quello di migliorare la salute dell'ospite attraverso la modulazione della flora intestinale ma con meccanismi differenti, contribuiscono a ridurre le infezioni, alla salute cardio-metabolica, aumentano la disponibilità dei minerali e contribuiscono alla modulazione immunitaria. I prebiotici non vengono utilizzati da tutta la

popolazione microbica intestinale ma al contrario sono il target specifico di alcuni ceppi e possono essere sostanze di origine naturale o sintetica. I prebiotici sono spesso associati alle fibre alimentari, ma solo una parte di queste possono essere definite come tali, mentre d'altra parte possono derivare da sostanze non fibrose come i polifenoli. Tra i composti più comuni troviamo le fibre solubili come l'inulina, i fruttoligosaccaridi (FOS), galattoligosaccaridi (GOS) e gli oligosaccaridi del latte umano (HMOs). Non sono presenti raccomandazioni ufficiali per quanto riguarda le quantità adeguate o raccomandate da assumere, in generale è necessaria una quantità di almeno 3 grammi o più per trarne beneficio.

In alcuni casi, soprattutto per quanto riguarda i bifidobatteri, si parla di sinbiotici, cioè di miscele di prebiotici e probiotici che insieme impattano positivamente sulla salute dell'ospite migliorando la sopravvivenza della flora intestinale.

Un altro concetto interessante è quello di "postbiotici" la cui definizione è stata data dall' International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) come "una preparazione di microrganismi inanimati e/o di loro componenti che conferiscono benefici per la salute dell'ospite". Il processo di costituzione di un postbiotico implica un passaggio di inattivazione delle cellule vitali del ceppo progenitore, effettuato attraverso trattamenti con il

calore, elevata pressione, radiazioni o l'esposizione a condizioni aerobie per i ceppi anaerobi stretti; è importante sottolineare che le preparazioni non sono tutte equivalenti ed è necessario testarne l'efficacia nello specifico per poterne valutare gli effetti benefici, se presenti (ISAAP).

### **1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii***

*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* è l'unico lievito probiotico di cui sono state studiate le potenzialità probiotiche e scoperti i suoi effetti benefici sia a livello preventivo che terapeutico per disturbi del tratto GI. Questo lievito possiede molte delle caratteristiche che lo rendono adatto per l'utilizzo come probiotico: è in grado di sopravvivere alle condizioni del tratto GI, ha un optimum di temperatura a 37°C e inibisce la crescita di alcuni microrganismi patogeni.

*S. boulardii* è stato testato in numerosi studi in doppio cieco per capirne la reale efficacia su problematiche del tratto GI. Da questi studi è emerso che ha un grande influenza nella prevenzione di diarrea associata agli antibiotici e per il trattamento di infezioni ricorrenti di *C. difficile*, in particolare in quest'ultimo caso se confrontato con probiotici batterici, il lievito probiotico è risultato molto più efficace, probabilmente in relazione alla sua naturale resistenza agli antibiotici.

Sono stati condotti molti altri studi di efficacia sugli effetti di gastroenterite acuta o la diarrea del viaggiatore con esiti positivi, ma devono essere investigati ulteriormente.

Inoltre molti studi *in vivo* su animali sono stati fatti per comprendere altri possibili meccanismi di azione di *S. boulardii* e tra questi ci sono: rilascio di sostanze in grado di inibire alcune tossine batteriche o i loro effetti patogeni; effetti trofici; attività anti-secretoria e immuno-stimolatoria sulla mucosa intestinale, effetti antiinfiammatori.

*S. boulardii* è considerato sicuro e ben tollerato, tranne che in rari casi di fungemia in pazienti con malattie severe intestinali o non, che hanno il catetere. Probabilmente questi rari casi di fungemia sono associati a una colonizzazione da parte del lievito del catetere, per questo l'unica raccomandazione è di evitare la somministrazione in pazienti con catetere.

*S. boulardii* è commercializzato in forma liofilizzata ad una concentrazione di 5 miliardi di microrganismi vivi, considerato come “farmaco probiotico” si distingue nettamente dai probiotici contenuti nei prodotti alimentari, usati sia per gli animali che per l'uomo per rafforzare la fisiologia dell'ospite, in assenza di qualsiasi contesto patologico (Czerucka D et al., 2007).

### 1.2. 3 Batteri e lieviti probiotici a confronto

Un aspetto importante è che mentre la maggior parte dei probiotici sono batteri, quindi cellule procariote, *S. boulardii*, così come tutti i lieviti, è una cellula eucariotica e per questo si distingue per alcuni aspetti.

Come già detto il microbiota intestinale è formato per la maggioranza da batteri, per un ammontare di circa  $10^{14}$  cellule, mentre i lieviti rappresentano meno dello 0,1% del microbiota. La maggior parte dei lieviti isolati dal tratto GI sono *Candida albicans* e occasionalmente anche *Torulopsis glabrata* e *Candida tropicalis*. Nonostante i lieviti siano presenti in numero molto minore rispetto i batteri, essendo essi cellule eucariotiche, hanno una dimensione 10 volte maggiore, che li rende un ostacolo sterico per i batteri per la colonizzazione dell'intestino.

Sappiamo che il tratto gastro-intestinale presenta una grande varietà di condizioni chimico-fisiche: ampie variazioni di pH e temperatura, presenza di sali biliari o di succhi pancreatici, ecc.. ciò condiziona fortemente la tipologia e la quantità di specie in grado di colonizzare i diversi tratti.

I lieviti sono stati trovati sia nello stomaco che nel colon, il primo caratterizzato da un pH di circa 2-3 mentre il secondo a pH neutro o leggermente alcalino (6,8-7,5), quindi in grado di crescere anche a pH molto diversi.

Un altro aspetto importante che differenzia i lieviti è che non sono influenzati dall'azione degli antibiotici. Nel mondo batterico la resistenza agli antibiotici è un problema sempre più diffuso e preoccupante, è stato osservato come i batteri lattici siano come dei serbatoi di 'antibiotico resistenza', in grado quindi di trasferire, potenzialmente, questa resistenza a batteri patogeni transienti nel tratto GI. Recenti studi hanno rilevato in *Lactococcus lactis*, Enterococchi e in specie di Lattobacilli, geni che conferiscono resistenza alla tetraciclina, eritromicina e vancomicina, simili a quelli trovati in batteri patogeni. Sicuramente sono necessari altri studi per poter chiarire la situazione, ma sotto questo punto di vista, i lieviti possono essere considerati sicuri (Mathur S et al., 2005).

Un altro aspetto da sottolineare è la differenza di composizione della parete cellulare e come questo influisca sulla diversa risposta immunitaria che innescano nell'organismo. I batteri presentano una parete rigida formata da peptidoglicano e, nel caso dei gram - anche uno strato ricco di lipidi chiamato lipolisaccaride (LPS), mentre nel caso dei gram +, nella parete cellulare sono presenti meno lipidi, contiene però acido lipoteicoico (LTA). I lieviti hanno una parete cellulare formata da due strati, quello più interno formato da chitina, 1,3- $\beta$ -glucano e 1,6- $\beta$ -glucano e quello più esterno formato da mannosio in associazione con proteine (PPM) o lipidi (PLM).

Nell'individuo, la prima linea di difesa del sistema immunitario è l'immunità innata, in cui specifici recettori (PRRs) riconoscono pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP). Peptidoglicano, LPS e LTA nei batteri e PLM, PPM e glicani nei lieviti sono riconosciuti da diversi PPRs e ciò potrebbe spigare le diverse risposte immunitarie innescate da questi microrganismi come "immunobiotici" (Clancy R., 2003).

Table 1. Major differences between yeast and bacteria and their probiotic implications

	Bacteria	Yeast	Probiotic implication
Presence in human flora	99%	<1%	
Cell size	1 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	Stearic hindrance
Cell wall	Peptidoglycan, LPS (Gram-negative <sup>-</sup> ), LTA (Gram-positive)	Chitin, mannose (PPM, PLM), glucan	Immune response via TLRs, lectin receptors
Optimal growth conditions			
pH	6.5–7.5	4.5–6.5	Different sites of action in the GI tract
Temperature (°C)	10–80	20–30	
Resistance to antibiotics	No	Yes	Safety in combination with antibiotherapy
Transmission of genetic material (e.g. resistance to antibiotics)	Yes	No	

LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; PPM, phosphopetidomannan; LPM, phospholipomannan; TLR, Toll-like receptor; GI, gastrointestinal.

Figura 6. Confronto tra batteri e lieviti per implicazioni probiotiche (Mathur S et al., 2005)



### **1.3 Insetti e microbiota**

Gli insetti sono il gruppo di animali più abbondante e diversificato, per quanto riguarda numero di specie, habitat ecologici e biomassa. La diversificazione e l'evoluzione degli insetti dipende in gran parte dalla miriade di relazioni positive che stabiliscono con numerosi microrganismi. Come per molte altre specie, la comunità microbica commensale è presente soprattutto a livello intestinale, dove mostra un ruolo fondamentale in moltissimi processi e fasi della vita dell'insetto: dalla digestione del cibo, assorbimento e detossificazione, alla crescita e lo sviluppo, è coinvolta, inoltre, nella risposta immunitaria e nel metabolismo (Philipp E. et al., 2013).

Semplificando, possiamo descrivere il sistema alimentare degli insetti come un lungo tubo continuo che va dalla bocca all'ano. La sua lunghezza varia in funzione delle diete dell'insetto, solitamente più corto nelle specie carnivore e più lungo per gli insetti fitofagi.

L'intestino ha tre regioni principali distinte in: stomodeo (anteriore), mesentero (medio) e proctodeo (posteriore). L'intestino anteriore e posteriore sono rivestiti da un esoscheletro costituito da chitina e glicoproteine, il quale viene sostituito ad ogni ecdisi; esso separa il lume intestinale dalle cellule dell'epidermide. Entrambi sono suddivisi in sottosezioni, nell'intestino

anteriore sono adibite allo stoccaggio del cibo mentre nell'intestino posteriore costituiscono camere di fermentazione o per trattenere le feci prima della defecazione. L'intestino medio è il sito principale di digestione e assorbimento in molti insetti, non presenta il rivestimento esoscheletrico, ma le cellule epiteliali in esso presenti secernono un involucro detto matrice peritrofica, continuamente sostituita. La matrice peritrofica divide il medio intestino in due spazi endo-, dove di solito si trovano i microrganismi, ed ecto-; è inoltre molto importante per la protezione dai danni meccanici dell'epitelio intestinale, dalle tossine e dall'invasione di microrganismi.

La struttura base dell'intestino degli insetti può avere delle specializzazioni in base a se presentano adattamenti a nicchie particolari o alle abitudini alimentari, molte di esse sono mirate ad accogliere i microrganismi che risiedono nell'intestino.

Nelle figura sottostante vengono raffigurate le specializzazioni dell'intestino di diversi insetti, i microrganismi sono rappresentati da puntini neri.

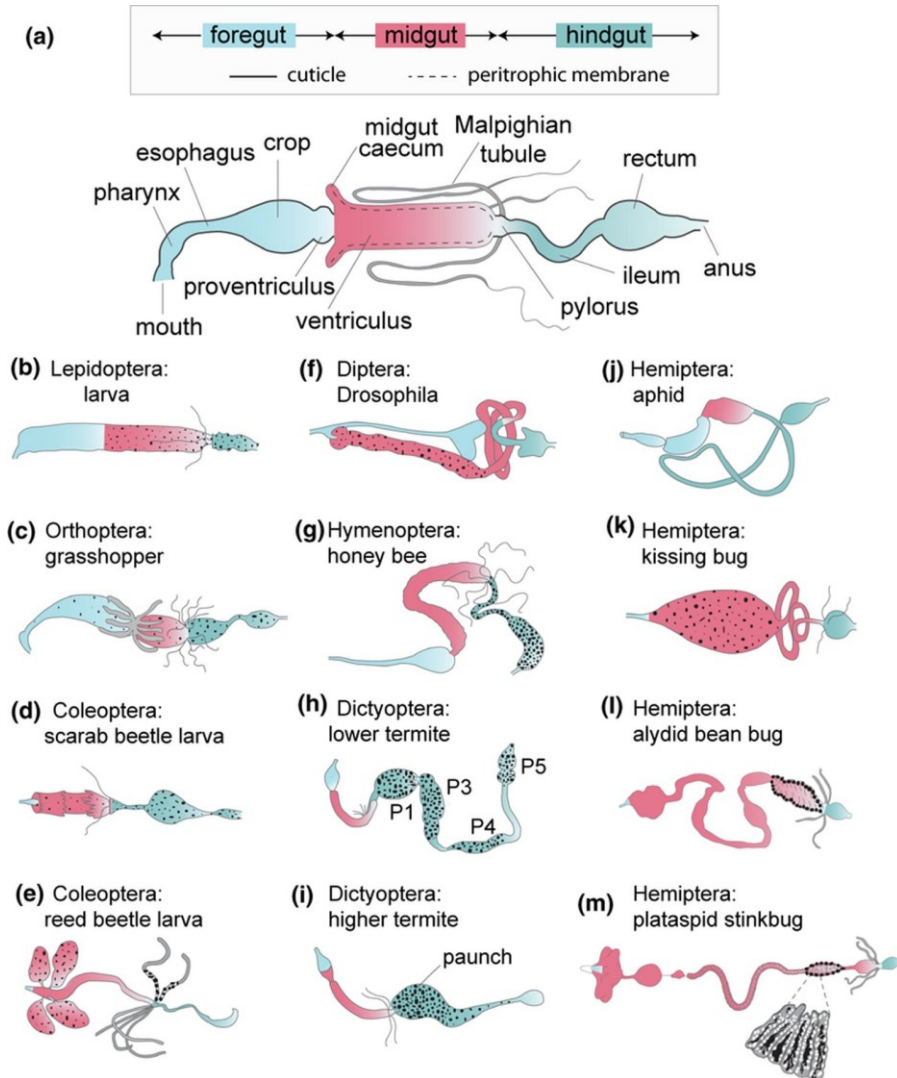


Figura 7. Rappresentazione grafica dell'intestino di vari insetti (Philipp E. et al., 2013)

Ad oggi i principali protagonisti degli studi condotti sul microbiota degli insetti sono i batteri, in quanto solitamente costituiscono la componente principale, ma anche funghi, protisti e archea svolgono ruoli importanti. I protisti sono molto studiati in alcune termiti e scarafaggi del legno, dove il loro mantenimento dipende proprio dalla connessione sociale tra gli individui. I

funghi sono frequenti nell'intestino degli insetti che si nutrono di legno o detriti, dove svolgono un ruolo nella loro digestione, così come gli archaea metanogeni in coleotteri e termiti.

### **1.3.1 Stabilità dell'intestino come habitat per i microrganismi**

Nella prospettiva di colonizzazione da parte di microrganismi, l'intestino degli insetti non rappresenta un ambiente molto stabile, il pH può variare da 7, nell'intestino anteriore, fino a condizioni di estrema acidità nell'intestino medio, oltre alla presenza di enzimi degradativi come il lisozima, in grado di degradare la parete batterica, e la chitinasi, responsabile della degradazione della parete fungina.

Inoltre, durante lo stato larvale, gli insetti sono soggetti alla muta dell'esoscheletro eliminando inevitabilmente le popolazioni batteriche ad esso associate, così come avviene nell'intestino medio con la sostituzione della matrice peritrofica. È stato studiato come negli olometaboli, nel momento della metamorfosi, l'intestino larvale viene completamente eliminato e con esso i microrganismi associati. Inoltre per la maggior parte degli insetti, durante il ciclo vitale le occasioni di contatto sono rare e ciò non favorisce il trasferimento di microrganismi tra individui, tuttavia, molti insetti presentano delle strutture specializzate che promuovono la persistenza microbica.

In *Dictyoptera*, *Hemiptera*, *Phthiraptera* e *Coleoptera* è stata trovata una struttura contenente i microrganismi simbiotici: il micetoma.

Il micetoma è composto da cellule dette micetociti, più grandi rispetto le cellule dell'insetto, possono trovarsi liberi nell'emocele, associati al tratto intestinale o risiedere nel tessuto adiposo. Nel loro citoplasma sono presenti microrganismi simbiotici che, nella maggior parte dei casi, sono ereditati dalla madre, solo nel caso dei coleotteri bostrichidi è stata riportata l'eredità paterna. La trasmissione dalla madre può avvenire in diverse modalità: attraverso l'imbrattamento esterno delle uova, il trasferimento transovarico o attraverso le ghiandole mammarie, negli insetti vivipari *Glossinidae* e *Hippoboscidae*.

Generalmente i simbiotici presenti nel micetoma sono batteri, ma in alcuni casi sono stati riscontrati anche dei lieviti, ad esempio *Coccidiascus legeri* è un simbionte intracellulare di *Drosophila funebri* e *D. melanogaster*, così come *Symbiotaphrina kochii* e *Symbiotaphrina buchneri* in *Stegobium paniceum* e *Lasioderma serricorne* (coleotteri anobidi). È importante considerare che nell'analisi dei simbiotici in molti casi non è possibile la loro coltivazione e l'identificazione si basa solo sulla loro morfologia, per questo molti generi potrebbero non essere riconosciuti (Philipp E. et al., 2013) (Stefanini I. 2018). Alcune specie di insetti, come scarafaggi, termiti, formiche, vespi e api mostrano comportamenti gregari e sociali, inclusi la trofallasi e la coprofagia,

che favoriscono la trasmissione diretta o indiretta di microrganismi e quindi un'evoluzione specializzata dei simbionti ospiti-dipendenti. Alcune volte le femmine sviluppano dei meccanismi di inculo delle uova o della progenie con microbi simbionti, consentendo così associazioni a lungo termine. Questi adattamenti dimostrano quanto sia importante il vantaggio evolutivo del mantenimento di un microbiota costante.

## **1.4 Interazione insetti-lieviti nel microbiota intestinale**

La maggior parte delle associazioni tra lieviti e insetti sono di tipo neutro, nessuno dei due riceve un beneficio dall'associazione con l'altro, ma qualche volta possono essere di tipo mutualistico (positive per entrambi), commensale (positivo per uno e neutro per l'altro), amensale (negativo per uno, neutro per l'altro) o parassitico (negativo per uno, positivo per l'altro). Gli studi fatti finora sono in gran parte rivolti a comprendere i vantaggi anziché gli svantaggi.

### **1.4.1 Vantaggi dell'associazione tra lieviti e insetti**

Se osserviamo la relazione da un punto di vista dell'insetto, i lieviti mostrano un importante ruolo per la localizzazione olfattiva del cibo, grazie alla produzione, attraverso fermentazione degli zuccheri, di sostanze volatili. Un esempio è rappresentato dai ceppi di *S. cerevisiae* che non sono solo in grado di produrre esteri acetati che attraggono *D. melanogaster*, ma che sono anche fondamentali per il suo sviluppo dallo stadio larvale a quello adulto. I lieviti forniscono a *D. melanogaster* azoto organico, vitamine essenziali come tiamina e riboflavina e lipidi, sono inoltre in grado di ripristinare la crescita delle larve esposte al sole. I lieviti giocano anche un ruolo durante l'accoppiamento in cui la femmina preferisce il maschio sulla cui faccia sono presenti il maggior

numero di lieviti o così come la presenza di lieviti nel regalo nuziale rende la femmina maggiormente feconda, la preferenza è da associarsi alla produzione di composti volatili.

Allo stesso modo anche le api ricevono grandi benefici dall'associazione con i lieviti, tanto che gli stessi apicoltori supplementano lo zucchero con cui nutrono gli alveari con lievito di birra. Si suppone che i lieviti supportino le attività delle api come la preparazione del pane d'api, un mix di polline e miele preparato e conservato come riserva di cibo dalle api operaie.

I lieviti aiutano gli insetti nella digestione di sostanze difficili da degradare, come ad esempio la cellulosa, emicellulosa e xilani presenti nel legno di cui si cibano le termiti. Gli scarabei ambrosia (*Platypodinae, Coleoptera*) scavano dei tunnel nei tronchi degli alberi, dove crescono "fungal gardens" che includono i lieviti in grado di digerire il legno, essi rappresentano la principale fonte di azoto, che scarseggia nel bosco, per gli scarabei.

Un ultimo esempio è rappresentato dalla capacità di mediare la sintesi dei ferormoni in scarabei della corteccia.

Dal punto di vista dei lieviti i benefici non sono ben compresi ad oggi. In generale si pensa che, grazie all'insetto, i lieviti possano essere trasportati attraverso substrati differenti e protetti da ambienti esterni non favorevoli. A differenza di batteri e funghi miceliali, i lieviti per poter colonizzare nuovi



ambienti devono essere veicolati da un vettore. In alcuni casi, la dispersione in nuovi ambienti rappresenta l'unica possibilità di sopravvivere nel momento in cui sono state sfruttate tutte le risorse del precedente.

Inoltre l'intestino degli insetti costituisce un buon ambiente fonte di nutrienti e può rappresentare una nicchia favorevole per alcune specie di lieviti, per limitare il numero e la variabilità di potenziali microrganismi competitori. È stato osservato, infatti, che l'intestino di alcuni scarabei, solitamente, contiene solo una specie di lievito, a supporto dell'ipotesi che l'ambiente intestinale regoli la composizione dei lieviti residenti.

#### **1.4.2 Applicazioni biotecnologiche**

Grazie alle loro caratteristiche metaboliche, i lieviti hanno un grande potenziale per le più svariate applicazioni biotecnologiche, ad esempio, la più nota abilità dei lieviti di attrarre gli insetti è stata sfruttata per creare trappole usate per catturare gli insetti erbivori, risultate più efficienti di quelle che usano solo attrattivi chimici .

La conoscenza relativa alle associazioni simbiote-insetto può fornire una base per il controllo di insetti nocivi per l'agricoltura o vettori di malattie per l'uomo, attraverso la manipolazione mirata dei simbionti. È stata sfruttata, ad esempio, come elemento di biocontrollo, l'associazione tra un granulovirus patogeno e

*M. pulcherrina*, è stato dimostrato come la loro associazione aumentasse significativamente la mortalità degli insetti neonati di *Cydia pomonella*, infestante dei meli, rispetto l'uso del solo virus.

La caratteristica dei lieviti di avere effetti immunomodulatori li rende adatti per l'utilizzo come probiotici per gli insetti la cui sopravvivenza è fortemente minacciata, a causa dell'uso di pesticidi e/o dall'infezione di parassiti e patogeni, come nel caso di *Apis mellifera*. La capacità di produrre sostanze antimicrobiche, inoltre, rende i simbionti un'importante linea di difesa per l'ospite contro predatori, parassiti, parassitoidi e patogeni.

Oltre ad essere fonti di molecole nutritive come aminoacidi, vitamine e steroli, i microrganismi simbionti sono anche in grado di sintetizzare enzimi digestivi, utili nel caso di un ospite la cui alimentazione sia carente di nutrienti o nel caso di colonizzazione di nuove nicchie, per le quali il repertorio metabolico dell'ospite sia inadeguato.

Sulla base delle tantissime applicazioni dei lieviti simbiotici degli insetti, questa ricerca si pone l'obiettivo di investigare ulteriormente le loro potenzialità probiotiche per l'uomo, ad oggi poco descritte.

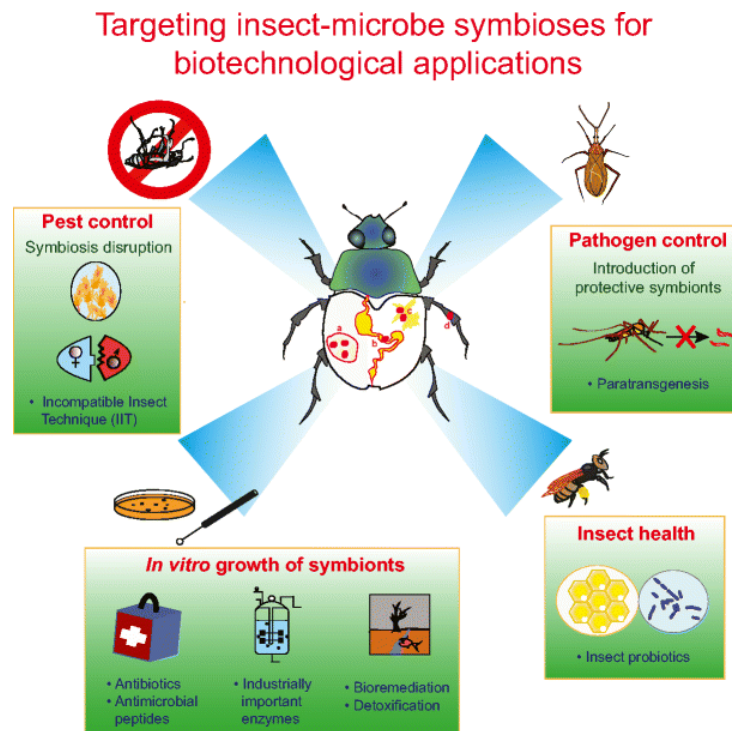


Figura 8. Applicazioni biotecnologiche dei simbiotici degli insetti (Berasategui A. et al., 2016)

## **1.5 Mappatura del microbiota: tecniche di isolamento e caratterizzazione**

La mappatura del microbiota ad oggi è frutto di tutte le informazioni ricavate da tecniche differenti fra loro.

Generalmente le tecniche utilizzate per la determinazione della composizione del microbiota si basano sul sequenziamento dell'rRNA 16S. L'rRNA 16S comprende 9 differenti regioni variabili (V1-V9), ognuna fiancheggiata da sequenze altamente conservate che rappresentano i siti di legame per i primer per la PCR. Attraverso l'amplificazione e il sequenziamento delle regioni variabili è possibile discriminare i microrganismi, a livello tassonomico, fino al genere, conoscenza che può essere approfondita analizzando l' "internally transcribed spacer" (ITS), una regione tra i geni dell'rRNA 16S e 23S, più variabile a livello interspecifico. Solo le analisi dell' rRNA 16S o dell'ITS non sarebbero sufficienti per una distinzione a livello di specie e sottospecie, ma il recente sviluppo delle tecnologie "omiche" ha permesso la caratterizzazione e la comprensione del ruolo del microbiota intestinale in maniera più approfondita, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

La metagenomica è una scienza che studia il genoma sfruttando il sequenziamento "shotgun" di frammenti di DNA isolati direttamente da uno specifico ambiente definiti "metagenoma". Ad esempio, il materiale genetico dell'uomo e quello del suo microbiota, il microbioma, rappresentano il

metagenoma umano, il quale non è un elemento statico, ma al contrario, molto dinamico, in quanto condizionato da tutti i fattori che influenzano la composizione del microbiota come dieta e stile di vita.

Lo “*Shotgun metagenome sequencing*” permette sia un’analisi tassonomica che funzionale, evitando il passaggio di amplificazione, essendo in grado, potenzialmente, di estrarre e analizzare tutto il DNA di campioni isolati dall’ambiente. Il sequenziamento *shotgun* permette di analizzare una grande quantità di geni coinvolti in molti processi metabolici, dall’analisi funzionale è possibile determinare la presenza di molte funzioni del microbiota come la resistenza agli antibiotici o la capacità di degradare i sali biliari. Le problematiche sono relative al grande numero di dati che si possono ottenere che spesso non siamo in grado di classificare correttamente, a causa della mancanza di informazioni soprattutto per quanto riguarda le popolazioni meno rappresentate. In parte le lacune possono essere colmate grazie agli studi di metatrascrittomica (sequenziamento di tutti gli RNA), metaproteomica (caratterizzazione di tutte le proteine) e metabolomica (identificazione di tutti i metaboliti) (Milani C. et al., 2017).

Infine, relativamente recente, è l'approccio "culturomico" che mira a colmare il divario che si è creato tra le specie sconosciute del microbiota non ancora coltivate e quelle invece che sono state isolate e coltivate grazie alle tecniche precedentemente descritte. La culturomica è un approccio culturale che sfrutta condizioni di crescita multiple per lo sviluppo del ceppo e la spettrometria di massa MALDI-TOF e il sequenziamento dell'rRNA 16S per l'identificazione della specie microbica.

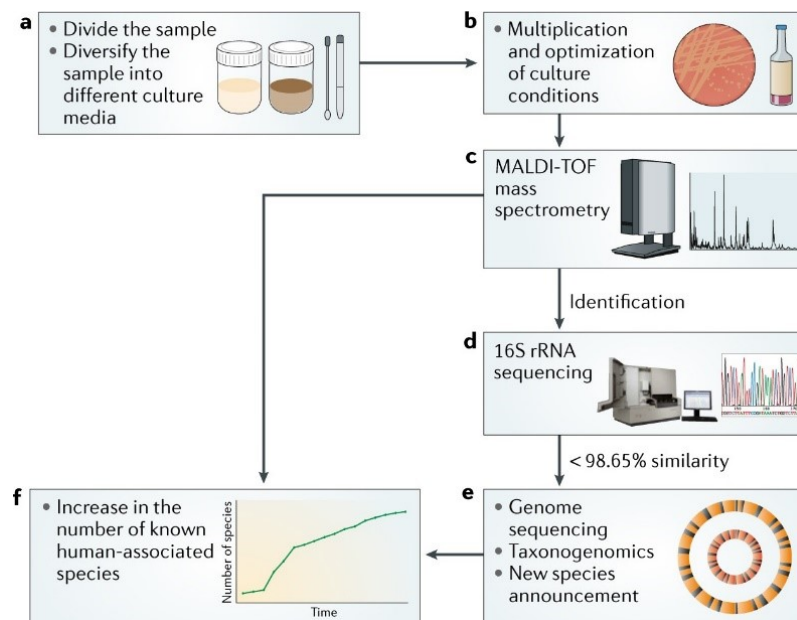


Figura 9. Schema riassuntivo dei passaggi eseguiti per la mappatura del microbiota [23]

Il primo step prevede la divisione del campione in sotto-sezioni e porre le diverse sezioni in condizioni di crescita differenti. Le condizioni di crescita sono tali da sopprimere lo sviluppo delle popolazioni presenti in maggioranza e di promuovere la crescita di microrganismi più esigenti presenti a basse concentrazioni. Successivamente grazie alla spettrometria di massa MALDI-

TOF si procede con l'identificazione delle specie isolate e, nel caso in cui non fosse sufficiente, si procede con il sequenziamento dell'rRNA 16S. Se presente meno del 98,65% di somiglianza con il ceppo più vicino geneticamente, l'isolato può essere definito una nuova specie. La scoperta di nuovi taxa sono poi confermati dal sequenziamento genomico e dalla comparazione con i database ad oggi raccolti (Lagier JC et al., 2018).

## **CAPITOLO 2. SCOPO DELLA TESI**

La presente ricerca ha lo scopo di esplorare le potenzialità del mondo microscopico, in cui batteri, funghi, lieviti, virus, non costituiscono solo un pericolo per l'uomo, ma un'inesauribile fonte di diversità, se ben sfruttata.

Nello specifico lo studio ha riguardato l'interazione presente tra insetti, e nello specifico Api mellifera e lieviti come suoi simbionti, nonché l'osservazione e la comprensione delle loro interazioni. I risultati saranno utili ad approfondire le conoscenze relative alla composizione e alla quantizzazione della componente eucariotica facente parte del microbiota delle api, nonché alla caratterizzazione di nuovi ceppi di lievito con caratteristiche probiotiche.

Sulla base di tali premesse, sono stati presi in considerazione i lieviti isolati da api, loro ambienti di vita e prodotti apicoli come propoli, pane d'api e polline per testarne le loro potenzialità probiotiche.

Le linee guida dell'OMS e FAO aggiornata al 2001 forniscono le indicazioni necessarie per testare e definire un microrganismo probiotico, sono stati testati quindi 55 ceppi per le loro capacità di sopravvivenza a 37°C, resistenza alla presenza di pH acido, sali biliari e pepsina, capacità di adesione all'epitelio intestinale, capacità di inibizione dei patogeni e le loro caratteristiche di sicurezza per l'uomo. I risultati ottenuti sono poi stati confermati da una



tipizzazione molecolare che ha consentito l'individuazione dei ceppi specifici  
in prospettiva di ulteriori studi e applicazioni in vivo.

## CAPITOLO 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Terreni di coltura

*YPD* (Yeast extract – Peptone – Dextrose) è un terreno ricco utilizzato per la crescita di lieviti, composto da:

1% estratto di lievito

2% glucosio

2% peptone

1,5% agar

*YPD broth* è un brodo ricco utilizzato per allestire le pre-culture di lieviti, composto da:

1% estratto di lievito

2% glucosio

2% peptone

*PBS* (Phosphate Buffered Saline) è una soluzione tampone utilizzata per i lavaggi e la sospensione dei lieviti nelle diverse prove, composta da:

NaCl 8 g/L

KCl 0,2 g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,24 g/L

Il PBS è stato utilizzato sia a pH 7 che a pH 2, il pH desiderato è stato ottenuto aggiungendo alla soluzione poche gocce di HCl 10% e sfruttando un pH-metro per la lettura del pH.

*Plate Count Broth* brodo nutriente per la crescita batterica. Composto da:

triptone 5 g/L

estratto di lievito 2,5 g/L

glucosio 1 g/L

*Nutrient agar*, terreno a base di peptoni utilizzato per la coltivazione di microrganismi non esigenti. Composto da:

Beef extract 3 g/L

Peptone 5 g/L

Agar 0,7%

*DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)* è un mezzo basale utilizzato per la crescita di cellule di mammifero, gentilmente fornito, già costituito, dal laboratorio di biochimica della prof.ssa Bacchetti Tiziana.

### **3.1.1 Preparazione delle pre-culture**

Ogni ceppo di lievito è stato coltivato su YPD e incubato per 48 ore in termostato a 30°C. Successivamente, per evitare contaminazioni, ogni piastra è stata conservata in cella fredda a 4°C per un tempo massimo di un mese, a seguito del quale è stata allestita una nuova coltura per ogni ceppo di lievito.

Ogni ceppo è stato coltivato in YPD broth inoculando 1 o 2 colonie precedentemente coltivate su YPD e incubato a 30°C. Le pre-culture vengono lasciate crescere per 1 o 2 giorni fino al raggiungimento di una concentrazione pari all'ordine di grandezza di  $10^7$ . La concentrazione è stata determinata attraverso lo spettrofotometro, la lettura è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 600 nm considerando che un'assorbanza di 0,1 corrisponde una concentrazione di  $10^6$  cell/mL. Successivamente le pre-culture standardizzate sono subito state utilizzate per le prove descritte successivamente.

### **3.2 Simulazione delle condizioni chimiche del tratto gastro-intestinale**

Per ogni ceppo è stata allestita una pre-cultura in 5 mL di YPD broth. Una volta standardizzate, le pre-culture sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti.

Dopo aver eliminato il surnatante, la biomassa è stata lavata due volte con 1

mL di PBS pH 7 e risospesa in 5 mL di PBS pH 7, pronta per procedere con la prova.

### **3.2.1 Sopravvivenza a 37°C e pH 2**

È stata valutata la capacità dei ceppi di sopravvivere all'esposizione al pH acido dello stomaco e la temperatura interna del corpo umano, condizioni tipiche del tratto GI. La sospensione cellulare è stata inoculata all' 1% (v/v) in PBS pH 2 per 4 ore, tempo medio di permanenza nel tratto gastro-intestinale, a 37°C. Dopo 4 ore sono state fatte diluizioni seriali e seminate aliquote (100 µL) su piastre di YPD incubate a 30°C per 48 h. Il ceppo probiotico *S. boulardii* è stato usato come controllo positivo. Il tasso di sopravvivenza è stato valutato in base alla crescita delle colonie su YPD, prendendo in considerazione anche la differenza tra la concentrazione iniziale e finale. (Amorim et al., 2018)

### **3.2.2 Tolleranza alla pepsina**

La pepsina è un enzima proteolitico che, attivato dall'ambiente acido dello stomaco, ha la funzione di digerire parzialmente le proteine. Un potenziale probiotico deve essere in grado di sopravvivere all'attività di idrolisi della pepsina che potrebbe danneggiare la membrana citoplasmatica o interferire con

le vie metaboliche, in quanto, per esplicitare la sua funzione, deve raggiungere l'intestino, vitale. (Charteris WP et al., 1998). È stata quindi valutata la capacità dei ceppi di tollerare e sopravvivere all'esposizione alla pepsina 3 g/L. La sospensione cellulare è stata inoculata all'1% (v/v) in PBS pH 2 con pepsina 3 g/L incubata a 37°C per 4 ore. Dopo 4 ore sono state fatte diluizioni seriali e seminate aliquote da 100 µL su YPD, incubate a 30°C per 48h. Il ceppo probiotico *S. boulardii* è stato usato come controllo positivo. Il tasso di sopravvivenza è stato valutato in base alla crescita delle colonie su YPD, prendendo in considerazione anche la differenza tra la concentrazione iniziale e finale. (Amorim et al., 2018)

### **3.2.3 Tolleranza ai sali biliari**

I sali biliari sono coinvolti nella digestione e assorbimento dei lipidi, oltre che nell'eliminazione del colesterolo in eccesso e di sostanze tossiche per l'organismo, per questa loro caratteristica è importante valutare la capacità dei lieviti di sopravvivere all'esposizione ai sali biliari 0,3% (v/v). La sospensione cellulare è stata inoculata all'1% (v/v) in PBS pH 7 con sali biliari 0,3% (v/v) incubata a 37°C per 4 ore. Dopo 4 ore sono state fatte diluizioni seriali e seminate aliquote (100 µL) su YPD. Il ceppo probiotico *S. boulardii* è stato usato come controllo positivo. Il tasso di sopravvivenza è stato valutato in base

alla crescita delle colonie su YPD, prendendo in considerazione la differenza tra la concentrazione iniziale e finale. (Amorim et al., 2018)

### 3.3 Autoaggregazione

Con lo scopo di comprendere al meglio le caratteristiche adesive dei ceppi studiati e quindi la loro attitudine alla formazione di biofilm a livello intestinale, è stata valutata l'autoaggregazione. L'autoaggregazione è un parametro indirettamente correlato alla capacità dei lieviti di aderire alla mucosa intestinale, una percentuale superiore al 80% corrisponde a forti capacità adesive. (Amorim et al., 2018)

I lieviti isolati sono stati coltivati per 24-48 h a 37°C in 5 mL di YPD broth. Una volta standardizzate, le colture sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 min e lavate due volte con 1 mL di PBS pH 7 e risospese in 5 mL di PBS pH 7. Dopo aver agitato la sospensione in un vortex per 10 sec, ne è stato prelevato 1 mL e inserito in una cuvetta. L'autoaggregazione è stata valutata al tempo 0 e dopo 2, 4 e 24 ore di incubazione a 37 °C attraverso lo spettrofotometro, misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 600 nm. Il ceppo probiotico *S. boulardii* è stato usato come controllo positivo.

La percentuale di autoaggregazione è stata espressa come:

$$\% \text{autoaggregazione} = [1 - (A_t / A_0)] \times 100$$

Dove  $A_0$  è l'assorbanza al tempo zero mentre  $A_t$  è l'assorbanza dopo 2h, 4h o 24h. (Amorim et al., 2018)

### **3.4 Idrofobicità della superficie cellulare**

Le interazioni con la mucosa intestinale sono considerate un equilibrio che si instaura tra forze elettrostatiche e interazioni idrofobiche. Così come l'autoaggregazione, anche la valutazione dell'idrofobicità della superficie cellulare rappresenta un parametro indiretto attraverso il quale valutare le capacità adesive. Come riportato in letteratura, ceppi con un'elevata idrofobicità hanno mostrato ottime capacità di aderire alla mucosa intestinale (Pan et al., 2006). I lieviti isolati sono stati coltivati per 24-48 h a 30°C in 5 mL di YPD broth. Una volta standardizzate, le colture sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato lavato due volte con 1 mL di PBS pH 7 e risospeso in 5 mL di PBS pH 7. Per ogni ceppo sono stati preparati due campioni in vials di vetro, il bianco in cui a 4,75 mL di campione è stata aggiunta 0,25 mL di acqua distillata e il campione in cui 4,75 mL di sospensione cellulare è stata posta in contatto con 0,25 mL di esadecano. Le soluzioni sono state agitate per 30 secondi e lasciate ferme per circa 2 ore fino alla separazione di due fasi. Successivamente è stata rimossa la fase acquosa sovrastante e misurata l'assorbanza a 600 nm attraverso uno spettrofotometro.



Dalla differenza di assorbanza tra il bianco e il campione si ricava la percentuale di idrofobicità, calcolata come:

$$\% \text{Idrofobicità} = (A_B - A_C) / A_B$$

In cui  $A_B$  è l'assorbanza del bianco e  $A_C$  l'assorbanza della fase acquosa del campione prelevata dopo 2 ore in condizioni stazionarie. Il ceppo probiotico *S. boulardii* è stato usato come controllo positivo. (Perricone et al., 2014)

### **3.5 Inibizione di ceppi microbici patogeni**

Tra le caratteristiche fondamentali di un probiotico c'è quella di apportare beneficio all'ospite, a tal fine, l'inibizione di batteri patogeni per l'uomo è una delle caratteristiche che un probiotico dovrebbe avere, utile per contrastare lo sviluppo del patogeno e le problematiche ad esso legate.

È stata quindi valutata la capacità dei ceppi di inibire la crescita di 5 patogeni quali *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *C. albicans*, *Staphylococcus aureus*. Le pre-colture batteriche sono state allestite in 5 mL di Plate Count Broth mentre *C. albicans* in 5 mL di YPD broth, fatte crescere per due volte a 37°C per 24 ore, fino al raggiungimento di una concentrazione di  $10^8$  UFC/mL

Le pre-colture dei ceppi di lievito sono state allestite in 5 mL di YPD broth, fatte crescere a 30°C per 24 ore. Un'aliquota (75µL) di ogni pre-coltura

standardizzata è stata inoculata al centro di una piastra di YPD e incubata a 30°C per 48 ore. Le piastre sono poi state ricoperte con uno strato (10 mL) di nutrient agar precedentemente inoculato con 1 mL di precoltura batterica e incubate a 37°C per 24 ore. Il ceppo probiotico *S. boulardii* è stato usato come controllo positivo. La valutazione dell'inibizione della crescita microbica viene effettuata osservando la presenza o meno di un alone di inibizione in corrispondenza dello spot della pre-coltura di lievito. (Perricone et al., 2014; Agarbati et al., 2020)

### **3.6 Capacità di adesione alla linea cellulare Caco-2**

Per definizione un probiotico deve essere in grado di aderire alla mucosa intestinale e colonizzarla. La barriera formata dalla microflora simbiote residente nell'intestino rappresenta la prima linea di difesa contro i patogeni, l'elevata affinità che presenta per le molecole di adesione delle cellule intestinali impedisce il legame e la successiva colonizzazione di batteri invasivi enteropatogeni (Dughera L., 2012). La Caco-2 è un linea cellulare immortalizzata isolata dall'adenocarcinoma coloretale umano, viene utilizzata *in vitro* per simulare la mucosa intestinale e per comprendere le possibili interazioni che essa stabilisce con i lieviti. È stata quindi valutata la capacità

dei ceppi di lievito di aderire a un monostrato di Caco-2 al fine di simulare le condizioni fisiche presenti *in vivo*. Le cellule Caco-2 sono state fornite dal laboratorio di biochimica della prof.ssa Bacchetti Tiziana, coltivate in una piastra multi-well da 24 pozzetti e portate a confluenza fino a raggiungere una concentrazione di  $4,5 \times 10^5$  CFU/mL e immerse nel mezzo di coltura DMEM.

I ceppi di lievito sono stati coltivati in 10 mL di YPD broth per 24 ore a 30°C, successivamente sono stati centrifugati a 4000 rpm per 5 min e il pellet lavato due volte con 1 mL di PBS pH 7 e risospesi in 10 mL di PBS pH 7. È stata quindi determinata la concentrazione cellulare attraverso il microscopio ottico usando la camera contaglobuli di Thoma Bright.

La concentrazione si ottiene sfruttando la formula:

$$\frac{n \text{ cell. tot.}}{64} \times 4.000.000 \times FD$$

In cui il “n. cell. tot.” è il numero di cellule contate in 4 quadranti casuali attraverso la camera di Thoma e “FD” il Fattore di Diluizione.

Una volta determinata la concentrazione è stata fatta una diluizione nel mezzo DMEM in modo tale da ottenere una concentrazione di  $4,5 \times 10^6$  cell/mL e quindi avere un rapporto lieviti-Caco-2 all'inoculo di 10:1. Si sfrutta la formula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Dopo avere eliminato il mezzo DMEM con cui erano mantenute le Caco-2, si inocula 1 mL di sospensione cellulare in ogni pozzetto e si incuba a 37°C per 1 ora. Per ogni ceppo è stato fatto un pozzetto di controllo, privo delle cellule Caco-2 e la prova in doppio. Dopo 1 ora si preleva il controllo e il mezzo contenuto nei pozzetti testati dove potenzialmente sono presenti le cellule non-adese. Segue la fase di distacco del monolayer: si esegue gentilmente un lavaggio dei pozzetti con 1 mL di PBS poi eliminato, segue l'aggiunta di 100 µL di tripsina per 5 min a 37°C che agisce andando a staccare le cellule dal fondo del pozzetto. Dopo il tempo di incubazione i 100 µL vengono recuperati e sospesi in 900 µL di acqua sterile, di questi vengono poi prelevati 100 µL per effettuare un ulteriore lavaggio. Vengono quindi fatte diluizioni seriali del controllo, cellule non-adese e cellule adese e seminate in piastre di YPD, incubate a 30°C per 48 ore. Le cellule adese vengono ottenute attraverso la formula:

$$\% \text{ Cell. adese} = \frac{\text{cell. adese} \times 100}{\text{cell. adese} + \text{cell. non adese}}$$

### **3.7 Safety analysis**

Secondo le linee guida emanate dalla FAO/WHO del 2001 i ceppi potenziali probiotici devono soddisfare delle precise caratteristiche di sicurezza in relazione alle caratteristiche conosciute del ceppo (Sanders ME et al., 2010).

Abbiamo quindi determinato la presenza o meno di:

- attività emolitica che comporta la distruzione dei globuli rossi con conseguente carenza di ferro per l'ospite;
- attività gelatinasica come fattore di virulenza tipico dei batteri patogeni;
- attività DNasica che comporta danni al materiale genetico

#### **3.7.1 Attività emolitica**

È stata valutata l'attività emolitica seminando uno spot di pre-coltura di lievito su terreno blood agar (5% sangue di montone defibrinato) e incubato a 37°C per 2-7 giorni. Il riscontro positivo all'attività emolitica è dato dalla presenza di un alone verde o chiaro intorno allo spot, un risultato negativo è associato invece all'assenza di aloni. (Pereira RP et al., 2021)

### **3.7.2 Produzione di gelatinasi**

La pre-coltura di lievito è stata inoculata, infilzando il terreno con il puntale, ad una concentrazione dell'1% e a una profondità di 5 mm, in tubi contenenti 10 mL gelatin agar, incubati a 37°C per 5-7 giorni. In seguito, i tubi sono stati posti in refrigeratore per 1 ora, si considera positivo il campione in cui c'è stata liquefazione della gelatina. (Pereira RP et al., 2021)

### **3.7.3 Attività DNasica**

La pre-coltura di lievito è stata strisciata su una piastra di DNasi agar e incubata a 37°C per 5-7 giorni. Per poter osservare i risultati, si versa una soluzione di HCl 1N sopra le colonie, si considera positivo, il campione in cui compare un alone di chiarificazione, negativo se non compare nessun alone. (Pereira RP et al., 2021)

## **3.8 Tipizzazione molecolare**

La tipizzazione molecolare è stata effettuata al fine di confrontare e identificare in maniera ceppo-specifica gli isolati. Combinando i risultati ottenuti da prodotti di PCR differenti è possibile determinare i biotipi e quindi individuare, nel caso, se siano presenti cloni, i quali possono essere stati selezionati

casualmente in doppio in fase di isolamento dalla matrice di origine. La tipizzazione molecolare prevede tre fasi: in una prima fase si estrae il DNA del lievito, vengono poi amplificate, attraverso una PCR, delle regioni specifiche dette “microsatelliti” e infine, attraverso l’elettroforesi, si effettua una separazione degli ampliconi sulla base del peso molecolare. Le regioni microsatelliti sono delle particolari porzioni del genoma dove una determinata sequenza si ripete per più volte, il numero di ripetizioni può variare tra ceppi differenti, caratteristica che viene quindi sfruttata per la distinzione.

### **3.8.1 Estrazione del DNA di lieviti non-Saccharomyces**

Protocollo usato sia per i campioni che per i controlli Saccharomyces. Diametro delle sferette di vetro 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ .

1. Crescita O.N. delle cellule su piastra YPD agar
2. Prelevare le cellule dalla piastra con un’ansa di plastica (1/8 della superficie totale) e metterle in un’epENDORF con 300  $\mu\text{L}$  di tampone ( 0,1 M Tris pH 8.5, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS)
3. Aggiungere le sferette di vetro (circa 1/3 del contenuto dell’epENDORF)
4. Vortexare 1 minuto e porre in ghiaccio per 1 minuto, ripetere per 3 volte
5. Bollire le epENDORF in acqua per 10 minuti
6. Mettere in ghiaccio per 3 minuti

7. Aggiungere 20  $\mu\text{L}$  Tris HCl 1M e 15  $\mu\text{L}$  EDTA 0,5 M
8. Aggiungere 50  $\mu\text{L}$  di SDS 10% e mescolare con la pipetta
9. Aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di Potassio acetato 5M (non piaccato) e spipettare brevemente
10. Porre 30 minuti in ghiaccio
11. Centrifugare 10 minuti a 14000 rpm
12. Prelevare 500  $\mu\text{L}$  di sovrnatante (buttare via le sferette) e aggiungere un ugual volume di isopropanolo freddo ( $-20^{\circ}\text{C}$ )
13. Incubare 5 minuti in ghiaccio e centrifugare 10 minuti a 14000 rpm
14. Eliminare il sovrnatante e aggiungere 500  $\mu\text{L}$  di etanolo al 70% freddo ( $-20^{\circ}\text{C}$ )
15. Centrifugare per 5 minuti ed eliminare l'etanolo
16. Risospendere su 100  $\mu\text{L}$  di TE pH 8
17. Incubare in stufa a  $30^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti
18. Spipettare bene, vortexare e conservare a  $-20^{\circ}\text{C}$

### **3.8.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)**

Per poter effettuare una biotipizzazione di lieviti non-Saccaromyces sono state effettuate tre PCR con tre primer distinti. È stata eseguita un tipo di PCR chiamata Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) in cui i



segmenti di DNA amplificati sono scelti casualmente, i primer selezionati sono: (GTG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (CAG)<sub>4</sub>. Nel caso dei primer (GTG)<sub>5</sub> e (GACA)<sub>4</sub> le due reazioni di amplificazione sono state condotte in un mix di reazione contenente: dNTP 2,5 mM, primer 25 µM, DNA 2,5 µL, Buffer 2,5 µL e H<sub>2</sub>O molecolare fino a raggiungere il volume finale di 25 µL. La PCR è stata condotta in un termociclatore effettuando un'iniziale denaturazione a 93°C per 5 minuti, a seguire 40 cicli di 93°C per 20 secondi, 55°C per 45 secondi e 72°C per 90 secondi, infine termina con un'allungamento a 72°C per 6 minuti (Corte L. et al., 2015).

Il mix di reazione contenente il primer (CAG)<sub>4</sub>:

5' – ARRTYCAGCAGCAGCAG – 3'

era composto da dNTP 10 mM, primer 50 µM, DNA 2,5 µL, Buffer 2,5 µL, e H<sub>2</sub>O molecolare fino al raggiungimento di un volume finale di 25 µL. la reazione di amplificazione è stata condotta in un termociclatore effettuando una denaturazione iniziale a 94°C per 5 minuti, a seguire 40 cicli di 94°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto e 72°C per 2 minuti, infine l'allungamento finale viene condotto a 72°C per 5 minuti.

### **3.8.3 Elettroforesi su gel d'agarosio**

I prodotti della PCR sono stati separati in un gel d'agarosio 2% in TBE 0,5x.

Il TBE 0.5X si ottiene mediante la diluizione di 100 mL di stock di TBE 5X costituito da 54 gr/L di Trizman Base, 27,5 g/L di Acido borico, 20 mL di EDTA con 900 mL di acqua deionizzata.

Ogni pozzetto del gel ha la capacità di 10  $\mu$ L, nel primo pozzetto vengono sempre caricati 3  $\mu$ L di marcatore (1 Kb DNA Ladder ready to use generuler<sup>tm</sup>) miscelato a 2  $\mu$ L di colorante Safe Green. L'ultimo pozzetto contiene il bianco costituito dalla miscela di reazione della PCR priva del DNA, miscelata a 2  $\mu$ L di colorante Safe Green. I pozzetti centrali vengono caricati con 8  $\mu$ L di amplificato miscelato a 2  $\mu$ L di colorante Safe Green.

La corsa elettroforetica è stata condotta a 80 V per circa 1 ora, successivamente i risultati su gel sono stati visualizzati attraverso l'uso di una lampada UV.

## CAPITOLO 4: RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Risultati delle prove di simulazione delle condizioni chimico-fisiche del tratto gastro-intestinale umano

Per l'isolamento dei lieviti sono state considerate api appartenenti a tre famiglie della specie *A. mellifera* subsp. *ligustica* site a Cesi coordinate 43°18'42"N 12°55'18"E, una frazione del Fabrianese. In particolare i lieviti sono stati isolati dal loro intestino o dalle zampe. L'intestino è stato estratto dal corpo dell'ape e immerso in PBS, trattato e successivamente utilizzato per la semina su YPD, mentre per poter isolare i lieviti dalle zampe, le api sono state lasciate camminare su una piastra con terreno di YPD per almeno 3 minuti. Tra le altre fonti di isolamento troviamo i fiori raccolti nel raggio di 5 km rispetto la posizione delle arnie, coerentemente con la distanza percorsa dalle api bottinatrici nell'arco di una giornata. I fiori sono stati campionati in giorni differenti in un arco temporale che va da giugno a settembre 2021, appartengono alle specie *Prunella vulgaris*, *Rubus ulmifolius*, *Centaureum erythraea*, *Echium Vulgare*, *Ligustrum lucidum*, *Menta longifolia*, *Lavandula officinalis*, *Medicago sativa*, *Daucus carota*, *Tauschia spp.*, *Pentanema squarrosum*, *Picris hieracioides*, *Hedera helix*, *Geranium sylvaticum*, *Helianthus tuberosus* e *Medicago sativa*. Infine alcuni lieviti sono stati isolati

da prodotti apiari come il polline, recuperato dal cassetto estraibile presente sull'arnia, caduto dalle corbicole delle api bottinatrici, il pane d'api o il propoli. Sono stati selezionati 55 ceppi di lievito appartenenti al phylum *Ascomycota*, riassunti in tabella 1, classificati in ordine alfabetico, con le relative informazioni sulla fonte di isolamento, il phylum e l'ID assegnato. . Rispetto al numero totale di isolati di lievito, pari a 142 ceppi, è stata fatta una selezione escludendo i ceppi potenzialmente patogeni. A tale proposito, tutti i *Basidiomycota* sono stati esclusi così come alcuni *Ascomycota* per cui è riportato, in letteratura, un potenziale effetto negativo sulla salute dell'uomo. *S. boulardi* è stato utilizzato come controllo positivo nelle varie prove in quanto è l'unico lievito probiotico in commercio e del quale quindi sono stati effettuati tutti i test.

Tabella 1. I 55 ceppi di lievito selezionati, isolati dall'intestino (fonte: api) o le zampe delle api (fonte: zampe), loro ambienti (fonte: fiore) o loro prodotti (fonte: pane d'api, propoli, polline)

Lievito	Phylum	Fonte di isolamento	ID
<i>Candida friedrichii</i>	Ascomycota	fiore	#65
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ascomycota	pane d'api	#24
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ascomycota	pane d'api	#83
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ascomycota	pane d'api	#25
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Ascomycota	zampe	#161
<i>Hanseniaspora lachancei</i>	Ascomycota	ape	#60
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#59
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#47

<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#50
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#154
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#17
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#90
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#91
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#46
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#16
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ascomycota	ape	#150
<i>Lachancea kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#72
<i>Lachancea kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#40
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Ascomycota	pane d'api	#21
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Ascomycota	pane d'api	#22
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	Ascomycota	fiore	#75
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	Ascomycota	pane d'api	#82
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	Ascomycota	propoli	#29
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	Ascomycota	propoli	#31
<i>Meyerozyma caribbica</i> (anamorph <i>Candida fermentati</i> )	Ascomycota	ape	#18
<i>Meyerozyma caribbica</i> (anamorph <i>Candida fermentati</i> )	Ascomycota	fiore	#71
<i>Meyerozyma caribbica</i> (anamorph <i>Candida fermentati</i> )	Ascomycota	ape	#26
<i>Meyerozyma caribbica</i> (anamorph <i>Candida fermentati</i> )	Ascomycota	ape	#58
<i>Meyerozyma caribbica</i> (anamorph <i>Candida fermentati</i> )	Ascomycota	ape	#95
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#48
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#51
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#85
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#36
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	propoli	#170
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#98
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	polline	#127

<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#73
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	ape	#94
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	pane d'api	#100
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ascomycota	pane d'api	#112
<i>Pichia kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#19
<i>Pichia kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#151
<i>Pichia kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#34
<i>Pichia kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#43
<i>Pichia kluyveri</i>	Ascomycota	ape	#89
<i>Pichia terricola</i>	Ascomycota	propoli	#158
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Ascomycota	ape	#44
<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	Ascomycota	ape	#88
<i>Starmerella apicola</i>	Ascomycota	polline	#149
<i>Starmerella apicola</i>	Ascomycota	polline	#173
<i>Starmerella apicola</i>	Ascomycota	polline	#160
<i>Starmerella bombicola</i>	Ascomycota	pane d'api	#2
<i>Starmerella bombicola</i>	Ascomycota	pane d'api	#3
<i>Starmerella bombicola</i>	Ascomycota	ape	#96
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Ascomycota	pane d'api	#117
<i>S. cerevisiae var. boulandi</i>	Ascomycota		Codex (C+)

La tabella 1 mostra i 55 ceppi di lieviti selezionati per testarne le relative capacità probiotiche, sono: 1 ceppo di *Candida friedrichii* (ID #65), 4 ceppi di *Debaryomyces hansenii* (ID #24, #83, #25, #161), 1 ceppo di *Hanseniaspora lachancei* (ID #60), 9 ceppi di *Hanseniaspora pseudoguilliermondii* (ID #59, #47, #50, #154, #17, #90, #91, #46, #16), 1 ceppo di *Hanseniaspora uvarum* (ID #150), 2 ceppi di *Lachancea kluyveri* (ID #72, #40), 1 ceppo di *Lachancea thermotolerans* (ID #21), 1 ceppo di *Metschnikowia pulcherrima* (ID #22), 4 ceppi di *Metschnikowia ziziphicola* (ID #75, #82, #29, #31), 5 ceppi di *Meyerozyma caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #71, #26, #58, #95),

11 ceppi di *Meyerozyma guilliermondii* (ID #48, #51, #85, #36, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112), 5 ceppi di *Pichia kluyveri* (ID #19, #151, #34, #43, #89), 1 ceppo di *Pichia terricola* (ID # 158), 1 ceppo di *Pichia kudriavzevii* (ID #44), 1 ceppo di *Saccharomyces kudriavzevii* (ID #88), 3 ceppi di *Starmerella apicola* (ID #149, #173, #160), 3 ceppi di *Starmerella bombicola* (ID #2, #3, #96), 1 ceppo di *Zygosaccharomyces rouxii* (ID #117).

Considerando la fonte di isolamento 32 sono stati i ceppi isolati dall'intestino delle api (indicati in tabella 1 con fonte di isolamento "ape"), 1 ceppo isolato dalle zampe delle api, 3 ceppi isolati da fiori, 11 ceppi isolati dal pane d'api, 4 ceppi isolati dalla propoli e 4 ceppi isolati dal polline.

La capacità di sopravvivere alle condizioni chimico-fisiche del tratto gastro-intestinale dell'uomo è una caratteristica che deve essere presente in un probiotico; a questo scopo, per valutare l'attitudine dei 55 ceppi ad un ambiente estremo per la presenza di pH acido o di enzimi idrolitici, sono state effettuate 3 diverse prove ponendo, in ognuna, i ceppi in condizioni simili a quelle presenti nel tratto GI, mimando il percorso che un lievito dovrebbe attraversare per poter arrivare al colon, sito principale di colonizzazione da parte del microbiota. Le tre prove sono state effettuate in sequenza: solo i ceppi con risultati positivi al primo test sono stati testati anche per il secondo e così via per tutti i test. In questo modo siamo in grado di selezionare solo i lieviti con

tutte le caratteristiche necessarie, senza le quali non riuscirebbero a sopravvivere, e le migliori, come la capacità di inibizione dei patogeni.

Come prima prova è stata valutata l'abilità dei ceppi di sopravvivere a 37°C e a pH 2, pH tipico dello stomaco, per poter fare un primo screening si è valutata la capacità di sopravvivenza o meno a queste condizioni attraverso degli spot su terreno di coltura YPD.

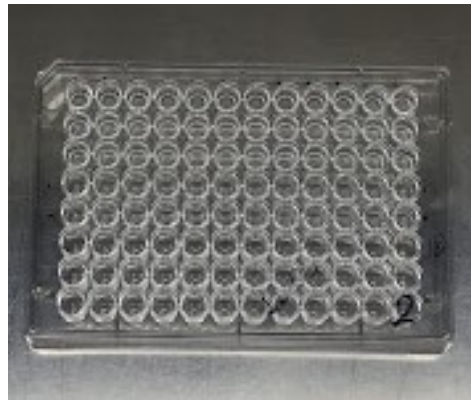


Figura 10. Piastra multiwell da 96 pozzetti, la prima riga è il sito di test, ogni pozzetto contiene 180  $\mu$ L di PBS a pH 2 e 20  $\mu$ L di pre-coltura. Dopo aver posto la piastra a 37°C per 4 ore, sono state effettuate le diluzioni in PBS sfruttando le righe successive.

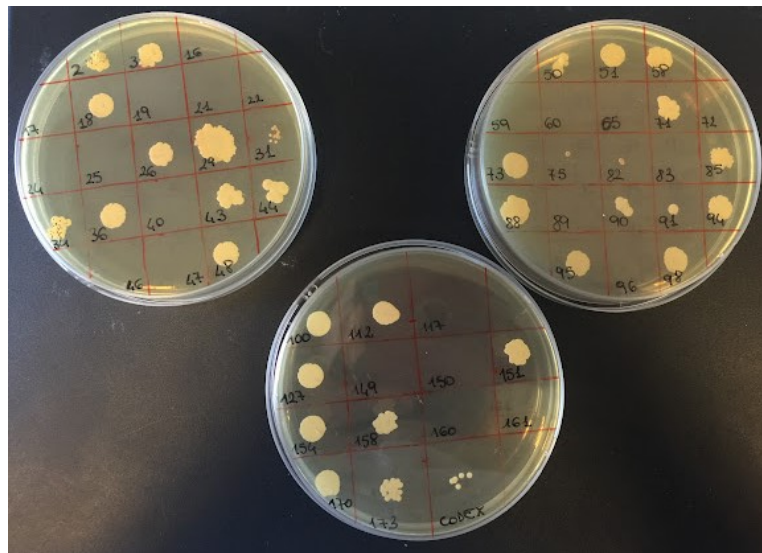


Figura 11. Spot di vitalità su terreno di coltura YPD dopo 48 h di incubazione a 30°C.



Sono risultati vitali, dopo 48 ore di incubazione a 30°C, 33 ceppi: 4 ceppi di *H. pseudoguilliermondii* (ID #50, #154, #90, #91), 4 ceppi di *M. ziziphicola* (ID #75, #82, #29, #31), 5 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #71, #26, #58, #95), 12 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #48, #51, #85, #36, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112), 3 ceppi di *P. kluyveri* (ID #151, #34, #43), 1 ceppo di *P. terricola* (ID # 158) , 1 ceppo di *P. kudriavzevii* (ID #44), 1 ceppo di *S. kudriavzevii* (ID #88), 1 ceppo di *S. apicola* (ID #173), 2 ceppi di *S. bombicola* (ID #2, #3). Gli spot di vitalità sono rappresentati in figura 11, le piastre sono state divise in quadranti, in corrispondenza dei quali, per ognuno è stato seminato un ceppo, identificato attraverso l'ID. Di questi 33 ceppi sono poi state effettuate le conte di vitalità su piastra seguendo lo stesso procedimento, ma seminando 100 µL su piastra di YPD. Grazie alle conte vitali è possibile determinare anche la concentrazione alla quale i vari ceppi sono risultati ancora vitali; tra i 33 ceppi in grado di sopravvivere a 37°C, 21 ceppi mantengono una concentrazione superiore a 10<sup>5</sup> cell/mL. Tale concentrazione è stata stabilita sia prendendo in considerazione la variazione di concentrazione delle cellule per ogni ceppo tra l'inizio della prova e dopo le 4 ore di incubazione a 37°C, sia confrontando le concentrazioni dei singoli ceppi dopo 4 ore di incubazione con quella del Codex, il controllo positivo. Il controllo positivo dopo 4 ore di incubazione ha mantenuto una concentrazione di circa

$10^6$  UFC/mL, simile alla concentrazione di partenza, sulla base di ciò sono stati quindi presi in considerazione quei ceppi la cui variazione di concentrazione nell'arco delle 4 ore fosse minima o positiva e che si mantenesse superiore a  $10^5$  cell/mL.

Nella tabella 2 sono elencati i 33 ceppi testati per la capacità di sopravvivere a  $37^\circ\text{C}$  e a pH 2, in giallo sono evidenziati i 21 ceppi in grado di mantenere una concentrazione superiore a  $10^5$  cell/mL e sono: 1 ceppo di *H. pseudoguilliermondii* (ID #154), 2 ceppi di *M. ziziphicola* (ID #82, #29), 5 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #71, #26, #58, #95), 10 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #48, #51, #85, #36, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112), 1 ceppo di *P. kluyveri* (ID #151), 1 ceppo di *S. kudriavzevii* (ID #88). Un esempio delle conte di vitalità effettuate è mostrato in figura 12, sono presenti due piastre dello stesso ceppo rappresentanti la semina di due diluizioni differenti 1:10000 a sinistra e 1:100000 a destra.

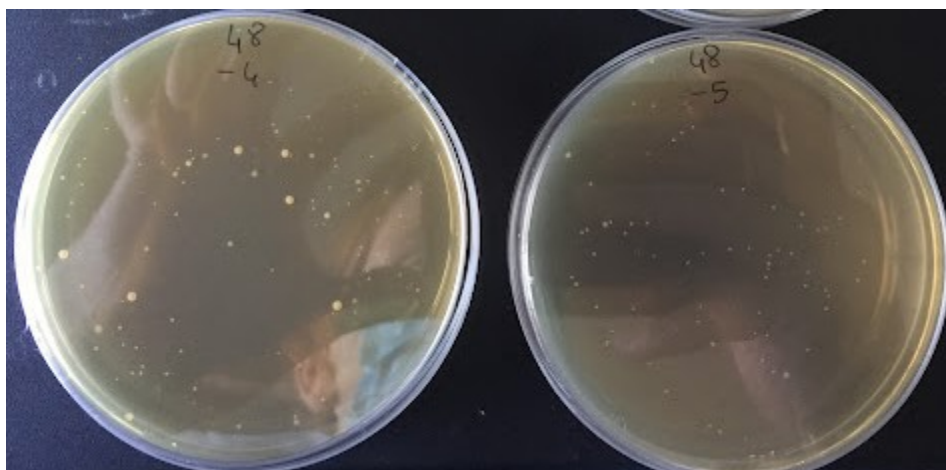


Foto 12. Conte di vitalità su piastra del ceppo *M. guilliermondii* (ID #48)

Tabella 2. I 33 ceppi testati per la capacità di sopravvivere a 37°C e pH2. Sono evidenziati in giallo i ceppi che hanno mantenuto una concentrazione superiore a 10<sup>5</sup> UFC/mL.

ID	Log UFC/mL T0	Log UFC/mL T4h	ID	Log UFC/mL T0	Log UFC/mL T4h
#50	5,76	4,00	#170	5,98	5,87
#154	5,87	5,92	#98	5,93	5,86
#90	5,90	4,95	#127	5,82	5,97
#91	5,91	5,08	#73	5,87	6,32
#75	6,00	4,00	#94	5,71	6,00
#82	5,77	5,58	#100	5,97	6,77
#29	5,77	5,54	#112	5,92	5,95
#31	5,82	0	#151	5,99	5,08
#18	5,84	5,51	#34	5,90	0
#71	5,98	6,33	#43	5,84	4,48
#26	5,96	5,61	#158	5,79	4,48
#58	5,87	6,00	#44	5,86	4,00
#95	5,76	5,95	#88	5,93	5,78
#48	5,86	5,57	#173	5,67	4,00
#51	5,89	5,90	#2	5,60	0
#85	5,87	5,91	#3	5,70	0
#36	5,75	5,28	<b>Codex</b>	5,95	5,91
			<b>(C+)</b>		

Un ulteriore livello di selezione è stato compiuto sui 21 ceppi appena selezionati. Su questi è stata testata la capacità di sopravvivere a 37°C, pH 2 e in presenza di pepsina (3 g/L). La pepsina è un enzima prodotto a livello gastrico sotto forma di pepsinogeno, la forma inattiva, che una volta entrato in contatto con l'acido cloridrico (HCl) viene attivato ed è in grado di digerire parte delle proteine introdotte con l'alimentazione.

Attraverso la stessa modalità del test precedente, utilizzando delle piastre multiwell da 96 pozzetti ed effettuando poi le conte vitali su piastra sono stati determinati i ceppi in grado di sopravvivere alla presenza di pepsina e con una concentrazione superiore a 10<sup>5</sup> UFC/mL.

Tabella 3. I 21 ceppi testati per la capacità di sopravvivere a 37°C, pH 2 e pepsina 3 g/L. In azzurro evidenziati i ceppi selezionati come positivi.

<b>ID</b>	<b>Log UFC/mL T0</b>	<b>Log UFC/mL T4h</b>	<b>ID</b>	<b>Log UFC/mL T0</b>	<b>Log UFC/mL T4h</b>
#154	5,87	5,24	#36	5,75	5,86
#82	5,77	4,85	#170	5,98	5,51
#29	5,77	6,34	#98	5,93	5,55
#18	5,84	5,50	#127	5,82	5,38
#71	5,98	5,75	#73	5,87	5,73
#26	5,96	6,33	#94	5,71	5,40
#58	5,87	5,41	#100	5,97	5,92
#95	5,76	5,49	#112	5,92	5,74
#48	5,86	6,12	#151	5,99	0
#51	5,89	5,55	#88	5,93	0
#85	5,87	5,82	<b>Codex (C+)</b>	5,95	4

Dei 21 ceppi ne sono stati selezionati 19, evidenziati in azzurro in tabella 3, in grado di sopravvivere in seguito all'esposizione alla pepsina. Si tratta di: 1 ceppo di *H. pseudoguilliermondii* (ID #154), 2 ceppi di *M. ziziphicola* (ID #82, #29), 5 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #71, #26, #58, #95), 11 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #48, #51, #85, #36, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112). Successivamente è stata testata la capacità di sopravvivenza dei lieviti selezionati sinora alle condizioni: temperatura 37°C, pH 7 e presenza di sali biliari 0,3%. I sali biliari, prodotti dal fegato e conservati nella cistifellea, vengono riversati nel duodeno dove hanno un ruolo nell'assorbimento e digestione dei lipidi.

Tabella 4. I 19 ceppi testati per la capacità di sopravvivere a pH 7 e in presenza di Sali biliari 0,3%. In verde i 17 ceppi selezionati positivamente.

ID	Log UFC/mL T0	Log UFC/mL T4h	ID	Log UFC/mL T0	Log UFC/mL T4h
#154	5,73	5,59	#85	5,72	5,90
#82	/	/	#36	5,55	6,00
#29	/	/	#170	5,70	5,40
#18	5,30	5,69	#98	5,67	5,86
#71	5,63	5,21	#127	5,73	5,83
#26	5,64	6,12	#73	5,51	5,75
#58	5,82	6,10	#94	5,78	5,89
#95	5,76	5,71	#100	5,79	5,95
#48	5,67	5,97	#112	5,64	5,72
#51	5,58	5,67	Codex (C+)	5,93	3,74

In tabella 4 sono elencati i 19 ceppi testati per l'abilità di crescere a temperatura 37°C, pH 7 e presenza di sali biliari 0,3%. I ceppi numero 82 e 29 sono stati esclusi per motivo di contaminazione microbica.

I 17 ceppi, evidenziati in verde in tabella 3, appartenenti alle specie: 1 ceppo di *H. pseudoguilliermondii* (ID #154), 5 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #71, #26, #58, #95), 11 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #48, #51, #85, #36, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112), mantengono una concentrazione superiore a  $10^5$  UFC/mL, sono quindi selezionati positivamente.

In sintesi, per quanto riguarda la resistenza alle condizioni chimico-fisiche del tratto gastro-intestinale 17 ceppi, tra i 55 inizialmente selezionati, hanno le caratteristiche necessarie per poter sopravvivere, appartenenti ai generi *Hanseniaspora* o *Meyerozyma*.

## 4.2 Risultati sulla capacità dei ceppi di lievito di aderire alla parete intestinale

L'adesione dei lieviti alla parete intestinale è un processo che coinvolge sia interazioni elettrostatiche che legami di tipo idrofobico, a questo scopo sono state valutate l'autoaggregazione e l'idrofobicità dei 17 ceppi che hanno superato le prime 3 prove.

Secondo la letteratura un valore di autoaggregazione maggiore dell'80% viene considerato molto buono. (Amorim JC et al., 2018)

Tabella 5. I 17 ceppi testati per la capacità di autoaggregazione, 11 di essi, evidenziati in rosa, hanno una percentuale di autoaggregazione buona o molto buona (>68%). L'ultima colonna presenta i dati relativi all'indice di idrofobicità (HI Hydrophobic Index)

ID	%Autoaggregazione 24h	HI%
#154	88,63	0
#18	70,08	10
#71	65,44	21
#26	86,07	13
#58	68,84	12
#95	75,18	0
#48	63,48	0
#51	69,28	3
#85	79,32	4
#36	65,62	0
#170	82,43	0
#98	63,11	0
#127	87,95	0
#73	73,32	9

<b>#94</b>	65,33	7
<b>#100</b>	81,88	0
<b>#112</b>	78,82	0
<b>Codex (C+)</b>	93,75	40

Tra i 17 sono stati selezionati i ceppi con una percentuale di autoaggregazione dopo 24 ore superiore al 68%. Sono stati quindi selezionati 11 ceppi evidenziati nella tabella 5, con caratteristiche di autoaggregazione buone (>68%) o molto buone (>80%). Nello specifico: 1 ceppo di *H. pseudoguilliermondii* (ID #154), 4 ceppi di *M. caribbica* (*anamorph C. fermentati*) (ID #18, #26, #58, #95), 9 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #51, #85, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112).

L'idrofobicità della superficie cellulare è un altro parametro importante per valutare l'attitudine del lievito ad aderire alla mucosa intestinale attraverso interazioni di tipo idrofobico. Inoltre, nella tabella 5 sono presenti gli indici di idrofobicità (HI %) dei diversi ceppi, se confrontati al controllo positivo, questi, hanno un HI% più basso o addirittura nullo. Esaminando i dati relativi all'idrofobicità c'è da considerare l'errore di esecuzione legato alla metodica e all'operatore. I dati sono stati comunque presi in considerazione.



### 4.3 Risultati prove di inibizione di batteri patogeni

Sui lieviti sinora selezionati ( 1 ceppo di *H. pseudoguilliermondii* ID #154, 4 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) ID #18, #26, #58, #95, 9 ceppi di *M. guilliermondii* ID #51, #85, #170, #98, #127, #73, #94, #100, #112) è stata valutata la capacità dei ceppi di inibire la crescita di batteri patogeni: *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *C. albicans*, *Staphylococcus aureus*. Vengono considerati positivi quei ceppi in grado di inibire 2 o più batteri patogeni.



Figura 13. *S. enteritidis* su terreno VRBGA

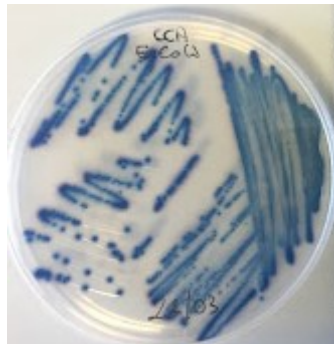


Figura 14. *E. coli* su terreno CCA



Figura 15. *S. aureus* su terreno Blood Agar

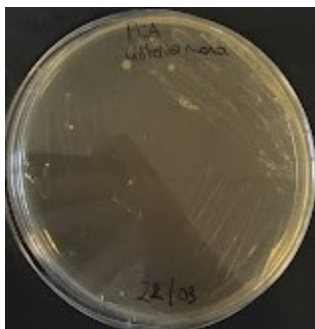


Figura 16. *L. monocytogenes* su terreno PCA



Figura 17. *C. albicans* su terreno YPD

La figura 13 rappresenta una coltura di *S. enteridis* su terreno Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) selettivo per la crescita di Enterobacteriaceae; la figura 14 rappresenta una coltura di *E. coli* su terreno Chromogenic Coliform Agar (CCA), la colorazione blu è tipica delle colonie di *E. coli*, che grazie all'attività  $\beta$ -glucuronidasica è in grado di degradare un substrato cromogenico presente nel terreno; la figura 15 rappresenta una coltura di *S. aureus* su terreno Blood Agar, terreno selettivo; la figura 16 rappresenta una coltura di *Listeria monocytogenes* su terreno Plate Count Agar (PCA), terreno generico; la figura 17 rappresenta una coltura di *C. albicans* su terreno Yeast-Extract Peptone Dextrose Agar, utilizzato per la coltura dei lieviti.

Tabella 6. I 12 ceppi testati per l'abilità di inibire la crescita di vari patogeni, 8 di essi, evidenziati in giallo, sono in grado di inibire 2 o più patogeni. (+ presenza inibizione; - assenza inibizione; ± inibizione parziale o incerta)

ID	L. monocytogenes	E. Coli	S. enteritidis	C. albicans	S. aureus
#154	-	+	-	-	-
#18	-	+	+	+	-
#26	-	+	+	+	-
#58	-	+	+	+	-
#95	-	+	+	-	-
#51	+	+	+	-	-
#85	-	+	+	+	-
#170	-	+	-	-	-
#127	-	+	+	-	-
#73	-	±	±	±	-
#100	-	+	±	-	-
#112	±	+	+	-	-
<b>Codex (C+)</b>	-	+	+	+	-

La tabella 6 elenca gli 11 ceppi testati per l'attività di inibizione di batteri patogeni, sono evidenziati in giallo i ceppi in grado di inibire 2 o più patogeni e sono: 4 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #26, #58, #95) e 4 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #51, #85, #127, #112).

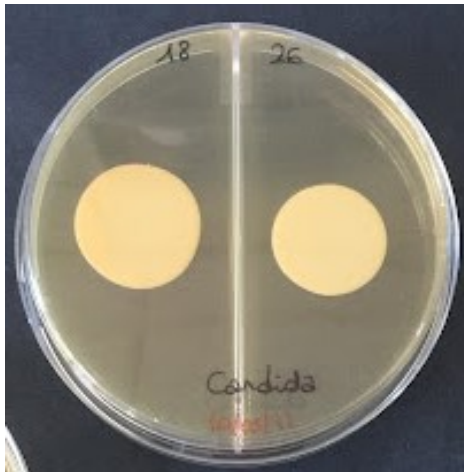


Figura 18a

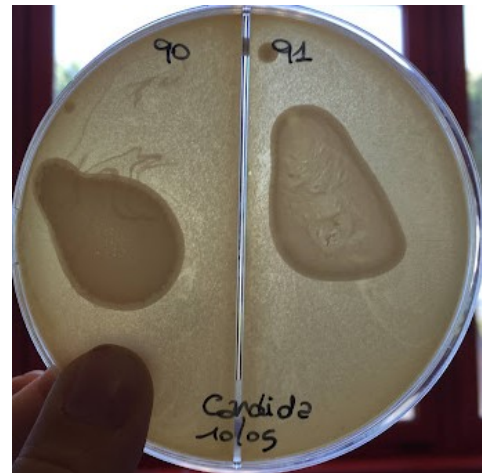


Figura 18b

Figura 18. Al centro della sezione per ogni piastra è presente uno spot di un ceppo differente. Nella figura 18a possiamo notare l'assenza di crescita nella zona circostante lo spot, segno di inibizione della crescita di *C. albicans*., Nella figura 18b è possibile osservare lo spot e la crescita di *C. albicans*, non sono presenti aloni di inibizione.

La figura 18 rappresenta due esempi di prova di inibizione dei patogeni. Nella figura 18a è presente una piastra su cui sono stati seminati due spot di due ceppi differenti, intorno allo spot si può notare come il terreno sia limpido, segno di inibizione della crescita del patogeno *C. albicans*. Nella figura 18b è mostrata una piastra su cui sono stati seminati due spot di due ceppi differenti, nella zona intorno allo spot e in corrispondenza dello stesso è presente crescita microbica di *C. albicans*, quindi assenza di inibizione.

#### 4.4 Risultati prove adesione a cellule Caco-2

L'abilità di colonizzare temporaneamente il tratto gastro-intestinale aderendo alla parete intestinale è una caratteristica importante per un potenziale lievito probiotico.

Gli 8 ceppi positivi a tutte le prove precedenti sono stati testati, *in vitro*, per la loro capacità di aderire a uno strato di cellule umane Caco-2.

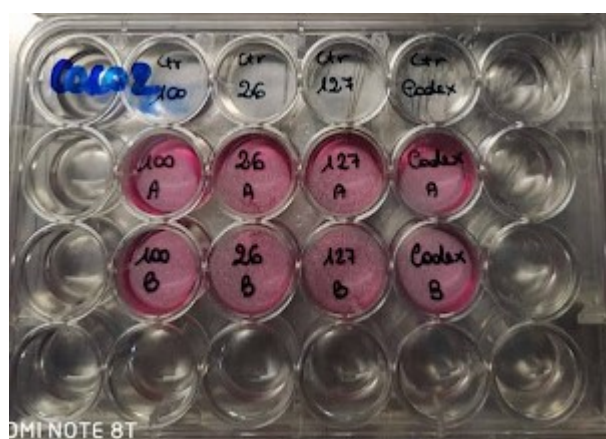


Figura 19. Piastra multiwell utilizzata per la prova di adesione a cellule Caco-2, nella prima fila sono presenti i controlli, privi dello strato di cellule Caco-2; la seconda e terza riga rappresentano le prove in doppio (A e B), in ogni colonna è presente un ceppo.

La figura 19 rappresenta una piastra multiwell da 24 pozzetti utilizzata per le prove di adesione a cellule Caco-2, la foto è stata scattata all'inizio dell'ora di incubazione a 37°C. Nella prima riga della piastra sono presenti i controlli cioè pozzetti privi della monolayer di Caco-2 adese sul fondo del pozzetto, le conte di vitalità dei controlli consentono di capire se nel corso dell'ora di incubazione ci sia stata o meno moltiplicazione dei lieviti, parametro da tenere in conto per il successivo calcolo della percentuale di adesione. Nella righe 2 e 3 sono

presenti, al centro, i pozzetti con le cellule Caco-2 adese al fondo, sommerse dalla sospensione cellulare in DMEM, di colore rosa. Ogni ceppo è stato testato in doppio, indicato dal numero ID e la lettera A o B.

I pozzetti utilizzati per la prova con Caco2 sono quelli centrali della piastra, in quanto i pozzetti più esterni sono anche i più soggetti a contaminazione.

Tabella 7. Ceppi e relative percentuali di adesione ad un monolayer di cellule Caco-2.

<b>ID</b>	<b>%Adesione</b>
<b>#18</b>	93,44%
<b>#26</b>	90,14%
<b>#58</b>	88,20%
<b>#95</b>	96%
<b>#51</b>	91,21%
<b>#85</b>	95,14%
<b>#127</b>	91,97%
<b>#112</b>	95,35
<b>Codex (C+)</b>	97,30%

La tabella 7 mostra i risultati della prova di adesione: 4 ceppi di *M. caribbica* (anamorph *C. fermentati*) (ID #18, #26, #58, #95) e 4 ceppi di *M. guilliermondii* (ID #51, #85, #127, #112); tutti presentano un'elevata percentuale di adesione.

Come riportato in letteratura è considerata molto elevata una percentuale di adesione superiore al 60%, tutti gli 8 lieviti testati risultano quindi essere in grado di aderire fortemente al monolayer di Caco2. (Živković M et al., 2018)

#### 4.5 Risultati safety analysis

Le caratteristiche di sicurezza di un probiotico sono imprescindibili, a differenza di altre caratteristiche che possono più o meno variare tra i diversi lieviti studiati, tutti devono rappresentare una sicurezza per la salute.

Seguendo le linee guida FAO/OMS del 2001 sono state testate la capacità emolitica, DNasica e gelatinasica; tutti gli 8 ceppi sono negativi per le 3 attività e quindi possono essere considerati sicuri.

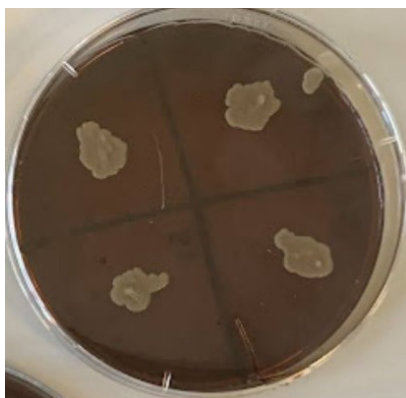


Figura 20. Piastra di blood agar divisa in 4 sezioni, in ogni sezione è presente uno spot di crescita di un ceppo di lievito differente. La negatività al test è data dall'assenza di aloni, prodotti dall'attività di emolisi, intorno allo spot.

La figura 20 rappresenta una piastra di blood agar suddivisa in 4 sezioni, in ognuna è presente uno spot di crescita di un lievito differente. Intorno agli spot non sono presenti aloni di chiarificazione, quindi, tutti i ceppi rappresentati sono negativi all'attività emolitica.

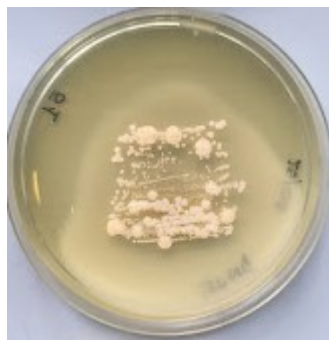


Figura 21. Piastra di DNasi agar con crescita di *M. guilliermondi* #51 al centro. La negatività è data dall'assenza di aloni di chiarificazione intorno alla crescita del lievito a seguito dell'esposizione a HCl 1N.

La figura 21 mostra una piastra di DNasi agar con al centro crescita del ceppo di lievito *M. guilliermondi* #51 utilizzato come esempio. L'alone più chiaro è dovuto all'esposizione ad alcune gocce di HCl 1N, necessarie per poter visualizzare se si forma o meno un alone di chiarificazione. La zona circostante allo sviluppo lievitifforme non mostra zone di chiarificazione, quindi è negativa all'attività DNasica.

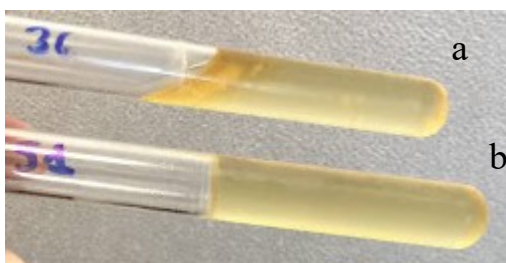


Figura 22. Tubi con gelatine agar in cui, in ognuno, è stato inoculato e lasciato crescere per 7 giorni un lievito. Nella parte centrale è presente il lievito *M. guilliermondi* #51 negativo in quanto la gelatina è in forma agarizzata. Il tubo superiore è invece un esempio di positività, data dalla liquefazione della gelatina nella parte superiore.

La figura 22 mostra i tubi contenenti Gelatin agar in cui sono stati inoculati due differenti ceppi di lievito e incubati per 7 giorni a 30°C. Dopo 1 ora in cella fredda a 4°C si osservano i risultati: il tubo “a” mostra nella parte superiore gelatina liquefatta, indice che il ceppo ha attività gelatinasica; il tubo “b”



presenta la gelatina completamente in forma agarizzata, non c'è stata attività gelatinasica.

#### 4.6 Risultati tipizzazione molecolare

Per poter identificare e classificare diversi ceppi di lievito è necessario fare una tipizzazione molecolare. Sfruttando tre diversi primer che amplificano regioni del genoma differente, è possibile, incrociando i dati ottenuti, determinare i biotipi.

Ogni primer è in grado di amplificare determinate regioni in cui è presente DNA microsatellite, queste zone del genoma sono caratterizzate dal fatto che la stessa sequenza, si ripete un numero variabile di volte e talvolta, il numero di ripetizioni è ceppo specifico. Ciò fa sì che in fase di corsa elettroforetica si possano distinguere per ceppi diversi, bande ad altezze diverse in quanto le regioni amplificate hanno un peso molecolare diverso.

Dai risultati precedentemente ottenuti, 8 ceppi hanno le caratteristiche necessarie per poter essere potenziali probiotici, in particolare 4 ceppi sono di *M. guilliermondii* e 4 ceppi di *M. caribbica*. Sono state effettuate 3 ISSR-PCR (Inter simple sequence repeats), è una tecnica che utilizza le sequenze microsatelliti come siti di appaiamento per i primers, questo metodo, unito

all'universalità di una RAPD, ci permette di distinguere un elevato numero di polimorfismi negli amplificati e quindi effettuare una tipizzazione molecolare.

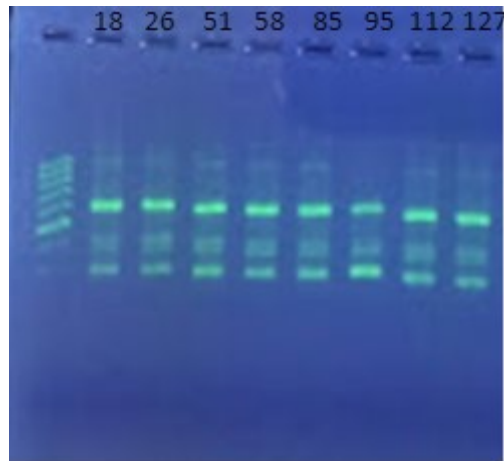


Figura 23. Visualizzazione del gel in cui sono presenti gli ampliconi del primer (CAG)<sub>4</sub>. Assenza di differenze tra le bande prodotte: biotico unico.

La figura 23 rappresenta la corsa elettroforetica degli ampliconi prodotti dal primer (CAG)<sub>4</sub>, tutte le bande risultano uguali. L'assenza di differenze è plausibile, in quanto abbiamo due specie molto simili tra loro, tanto che la distinzione tra le due specie *M. caribbica* e *M. guilliermondii* risale a recenti ricerche, a seguito di caratterizzazione genetica e biochimica.

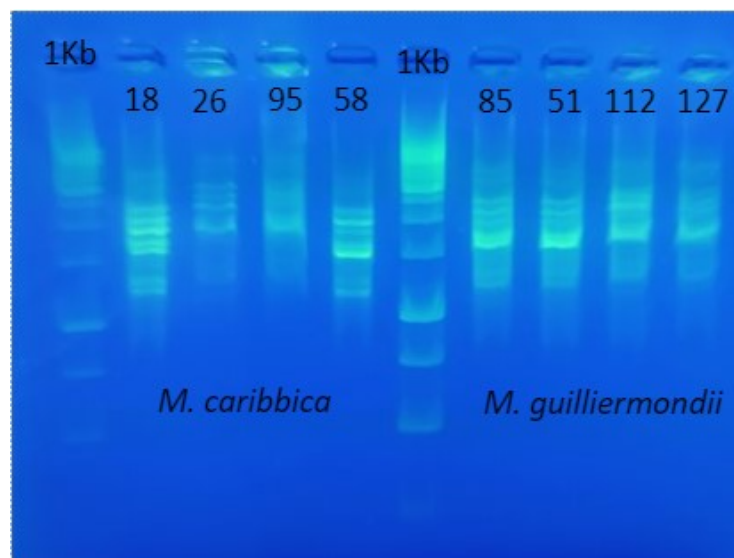


Figura 24. Visualizzazione del gel in cui sono presenti gli ampliconi del primer (GACA)<sub>4</sub>. Da destra troviamo il primer 1 Kb, i 4 ceppi di *M. caribbica* (18,26, 95, 58), il primer 1 Kb e i 4 ceppi di *M. guilliermondii* (85, 51, 112, 127).

Nella seconda PCR è stato utilizzato il primer (GACA)<sub>4</sub>, in questo caso è stato possibile fare delle distinzioni in quanto sono presenti profili elettroforetici differenti, mostrati in figura 24. Distinti 6 biotipi riassunti in tabella 8 e sono: biotipo I *M. caribbica* #18, biotipo II *M. caribbica* #26, biotipo III *M. caribbica* #95, biotipo IV *M. caribbica* #58, biotipo V *M. guilliermondii* #85 e #51, biotipo VI *M. guilliermondii* #112 e #127.

Tabella 8. Rappresentazione schematica dei biotipi distinti grazie all'uso del primer (GACA)<sub>4</sub>

	Codice ceppo	(GACA) <sub>4</sub>
<i>M. caribbica</i>	18	I
	26	II
	95	III
	58	IV
<i>M. guilliermondii</i>	85	V
	51	V
	112	VI
	127	VI

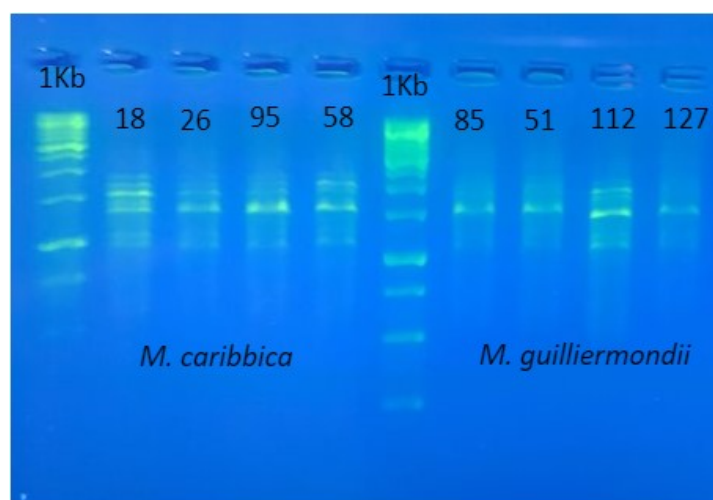


Figura 25. Visualizzazione del gel in cui sono presenti gli ampliconi del primer (GTG)<sub>5</sub>. Da destra troviamo il primer 1 Kb, i 4 ceppi di *M. caribbica* (18,26, 95, 58), il primer 1 Kb e i 4 ceppi di *M. guilliermondii* (85, 51, 112, 127).

Il terzo gel visualizzato in figura 25 mostra il profilo elettroforetico degli ampliconi prodotti dal primer (GTG)<sub>5</sub>, anche in questo caso è stato possibile distinguere 3 biotipi differenti. I biotipi riportati nella tabella 9 sono: biotipo I

*M. caribbica* #18, biotipo II *M. caribbica* #26 e #95 e *M. guilliermondii* #85, #51 e #127; biotipo III *M. caribbica* #58 e *M. guilliermondii* #112.

Tabella 9. Rappresentazione schematica dei biotipi distinti grazie all'uso del primer (GTG)<sub>5</sub>

	Codice ceppo	(GTG) <sub>5</sub>
<b>M. caribbica</b>	18	I
	26	II
	95	II
	58	III
<b>M. guilliermondii</b>	85	II
	51	II
	112	III
	127	II

Combinando i risultati ottenuti dalle 3 corse elettroforetiche è possibile determinare se i vari ceppi siano effettivamente differenti o se casualmente, in fase di campionamento, sia stato isolato lo stesso ceppo due volte.

Tabella 10. Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalle 3 PCR.

	Codice ceppo	(CAG) <sub>4</sub>	(GACA) <sub>4</sub>	(GTG) <sub>5</sub>	Biotipo finale
<b><i>M. caribbica</i></b>	<b>18</b>	I	I	I	<b>I</b>
	<b>26</b>	I	II	II	<b>II</b>
	<b>95</b>	I	III	II	<b>III</b>
	<b>58</b>	I	IV	III	<b>IV</b>
<b><i>M. guilliermondii</i></b>	<b>85</b>	I	V	II	<b>V</b>
	<b>51</b>	I	V	II	<b>V</b>
	<b>112</b>	I	VI	III	<b>VI</b>
	<b>127</b>	I	VI	II	<b>VII</b>

Il biotipo finale è stato determinato da una specifica combinazione dei biotipi determinati con i singoli primer.

Se prendiamo in considerazione, per esempio, i ceppi #112 e #127 di *M. guilliermondii* possiamo notare che per gli ampliconi dei primer (CAG)<sub>4</sub> e (GACA)<sub>4</sub> i due ceppi mostrano lo stesso profilo elettroforetico, ma nel caso della corsa elettroforetica dove è stato utilizzato, in fase di amplificazione, il primer (GTG)<sub>5</sub>, mostrano profili differenti e ciò è sufficiente per poter classificarli come due ceppi distinti. Lo stesso ragionamento è applicabile ai ceppi #85 e #51 di *M. guilliermondii*, in questo caso in tutte e tre le corse elettroforetiche, i due isolati mostrano profili simili o uguali, ciò ci permette di ipotizzare, con elevata probabilità, che si tratti dello stesso ceppo di *M. guilliermondii*.

Possiamo affermare quindi, dalla tipizzazione molecolare, che degli 8 ceppi isolati, 7 hanno biotipi differenti mentre gli ID #85 e #51 di *M. guilliermondii* molto probabilmente rappresentano lo stesso ceppo.

## CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

La maggior parte degli studi fatti ad oggi sul microbiota animale riguarda la popolazione batterica, ma anche i lieviti si sono dimostrati validi alleati nella tutela della salute, ne è un esempio *S. boulardii*, i cui effetti positivi sono spesso unici e assenti tra le specie batteriche in commercio.

Diversi studi hanno individuato tra i generi *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma* e *Torulaspota* dei potenziali probiotici, che potrebbero essere utilizzati nella produzione di cibi fermentati, contribuendo al miglioramento delle proprietà nutrizionali e sensoriali. L'utilizzo di lieviti ad azione probiotica, vista la loro capacità fermentante, apre la strada alla produzione di cibi funzionali alternativi, che non siano prodotti dell'industria casearia, come la maggior parte in commercio, ma prodotti fermentati come il the kombucha o il kimchi. (Staniszewski, A et al., 2021)

Questo studio mira alla ricerca di nuovi ceppi di lievito ad azione probiotica esplorando l' habitat delle api come serbatoio di isolamento.

Questa ricerca ha permesso di selezionare fra i lieviti appartenenti al *core gut microbiota* dell'ape, sette ceppi appartenenti a due specie di lieviti, quali *M. caribbica* e *M. guilliermondii*, con tutte le caratteristiche necessarie per poterli definire potenziali probiotici. La letteratura conferma i dati ottenuti: in uno studio di Amorim et al. è stato confrontato il lievito *S. boulardii* con *M.*



*caribbica*, il quale ha mostrato *in vitro* caratteristiche molto simili al già noto probiotico Codex. (Amorim et al., 2018). Allo stesso modo, sono state riscontrate delle risposte molto simili alle condizioni del tratto gastro-intestinale tra *S. boulardii* e *M. guilliermondii* (anamorph *Pichia guilliermondii*) (Oliveira et al., 2017).

Oltre le potenzialità di *M. guilliermondii* testate nel presente studio, si annoverano inoltre l'attività antifungina (Coda R. et al., 2013), l'attività antibatterica (EL Joel et al., 2013) e la produzione di nerolo, un monoterpene aciclico utilizzato nell'industria cosmetica, parafarmaceutica e alimentare (Mo, X. Et al., 2020). Mentre sono presenti alcuni studi sulle caratteristiche di *M. caribbica* come elemento di biocontrollo, ad oggi non sono ancora state evidenziate applicazioni in ambito sanitario.

In vista delle potenzialità di queste due specie e dunque dei 7 ceppi che sono stati isolati e studiati, la presente ricerca pone le basi per ulteriori studi *in vivo* e future applicazioni.

## **BIBLIOGRAFIA**

Agarbati A, Canonico L, Marini E, Zannini E, Ciani M, Comitini F. Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods*. 2020;

Amorim JC, Piccoli RH, Duarte WF. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Res Int*. 2018;

Arumugam M et al., Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;

Basmaciyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P, Dalle F. "Candida Albicans Interactions With The Host: Crossing The Intestinal Epithelial Barrier". *Tissue Barriers*. 2019;

Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M. Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol*. 1998

Chen, LS., Ma, Y., Maubois, JL. et al. Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Sci. Technol*. 90, 537–548 (2010).

Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003;

Coda R., Carlo G. Rizzello, Raffaella Di Cagno, Antonio Trani, Gianluigi Cardinali, Marco Gobbetti, Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread, Food Microbiology, 2013;

Corte L, di Cagno R, Groenewald M, Roscini L, Colabella C, Gobbetti M, Cardinali G. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. Food Microbiol. 2015

Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review article: yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. Aliment Pharmacol Ther. 2007;

Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. J Physiol. 2017;

Dughera L., Microbiota intestinale, probiotici e benessere Servizio di Motilità ed Endoscopia Digestiva, Azienda Ospedaliera Universitaria “San Giovanni Battista”, Torino, 2012;

Elizabeth Thursby, Nathalie Juge; Introduction to the human gut microbiota. Biochem J 1 June 2017;

EL Joel, BV Bhimba, Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*, 2013, Alexandria Journal of Medicine

FAO/WHO Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Cordoba, Argentina, 1-4 Ottobre 2001

Franca Marangoni, Probiotici: Caratteristiche e indicazioni, Centro Studi dell'Alimentazione, Nutrition Foundation of Italy

Garrett WS. Cancer and the microbiota. Science. 2015;

Hallen-Adams HE, Suhr MJ. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. Virulence. 2017;

Hornef M. Pathogens, Commensal Symbionts, and Pathobionts: Discovery and Functional Effects on the Host. ILAR J. 2015;

ISAAP, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics  
<https://isappscience.org/a-postbiotic-is-not-simply-a-dead-probiotic/>

ISS, Istituto superiore di sanità <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z-menu/f/flora-intestinale-microbiota-e-microbioma>

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. World J Gastroenterol. 2015;

Lagier, J.C., Dubourg, G., Million, M. et al. Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol* 16, 540–550 (2018);

LeBlanc JG et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;

Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *Int J Food Microbiol*. 2005;

McFarland L. V. & Bernasconi P. (1993) *Saccharomyces boulardii*'. A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent, *Microbial Ecology in Health and Disease*

Milani C et. al, The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2017;

Mo, X., Cai, X., Hui, Q. *et al*. Whole genome sequencing and metabolomics analyses reveal the biosynthesis of nerol in a multi-stress-tolerant *Meyerozyma guilliermondii* GXDK6. *Microb Cell Fact* **20**, 4 (2021);

Modi SR, Collins JJ, Relman DA. Antibiotics and the gut microbiota. *J Clin Invest*. 2014 Oct;

Nejman D et al. The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science*. 2020;

Oliveira et al., Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 44 (2017);

Pan, W. H., Li, P. L., & Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*;

Pereira RP, Jadhav R, Baghela A, Barretto DA. In Vitro Assessment of Probiotic Potential of *Saccharomyces Cerevisiae* DABRP5 Isolated from Bollo Batter, a Traditional Goan Fermented Food. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021;

Perricone M, Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M. Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiol*. 2014;

Philipp Engel, Nancy A. Moran, The gut microbiota of insects – diversity in structure and function, *FEMS Microbiology Reviews*, September 2013;

Sanders ME et al. Probiotic use in at-risk populations. *J Am Pharm Assoc* (2003). 2016 Nov-Dec;

Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspenger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010

Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods* 2021;

Stefanini I. Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*. 2018;

Walker, A., Ince, J., Duncan, S. et al. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* 5, 220–230 (2011);

Živković M, Čadež N, Uroić K, Miljković M, Tolinački M, Doušova P, Kos B, Šušković J, Raspor P, Topisirović L, Golić N. Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2015.