



Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie,  
l'Energia e lo Sviluppo Economico Sostenibile



*Ministero dello Sviluppo Economico*

RICERCA DI SISTEMA ELETTRICO

Studio delle popolazioni microbiche riguardanti processi di  
fermentazione anaerobica in condizioni di mesofilia

*Silvia Silvi, Paolo Barghini, Massimiliano Fenice*



Report RdS/2011/287

STUDIO DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RIGUARDANTI PROCESSI DI FERMENTAZIONE  
ANAEROBICA IN CONDIZIONI DI MESOFILIA

Silvia Silvi, Paolo Barghini, Massimiliano Fenice (Università della Tuscia)

Settembre 2011

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Studi sulla produzione elettrica locale da biomasse a scarti

Responsabile Progetto: Angelo Moreno, ENEA

## STUDIO DELLE POPOLAZIONI MICROBICHE RIGUARDANTI PROCESSI DI FERMENTAZIONE ANAEROBICA IN CONDIZIONI DI MESOFILIA.

### Introduzione

Questo progetto propone un'indagine sulla biodiversità delle popolazioni microbiche coinvolte in fermentazioni anaerobiche in condizioni di mesofilia.

Un approfondimento sull'ecologia microbica permette di ottenere un completo e corretto quadro della distribuzione dei microrganismi studiati e in parallelo, anche di ampliare gli studi sulla loro tassonomia e sulla fisiologia. La biodiversità microbica può essere studiata mediante l'applicazione di metodi colturali (metodi tradizionali basati su, isolamento diretto ed isolamento dopo procedura di arricchimento mediante l'utilizzo di un substrato specifico) proposti dalla microbiologia classica o mediante metodi molecolari colture-indipendenti (tecniche di fingerprinting) tra cui: DGGE, TGGE, T-RFLP, "Deep Sequencing", ecc.

Le tecniche fingerprinting consentono di stimare e di comparare, in modo relativamente semplice e veloce, i livelli di diversità nella comunità microbica e di monitorare i cambiamenti della sua struttura. Nonostante producano solo un'immagine parziale della comunità identificando solo le sue componenti dominanti, queste metodiche offrono un ottimo compromesso tra il numero dei campioni da analizzare e l'informazione ottenuta risultando fondamentali in situazioni in cui si conosce poco o nulla della comunità stessa.

L'analisi della biodiversità microbica sui diversi campioni oggetti di questo studio (campioni-MIX) è stata condotta mediante l'applicazione della tecnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

La DGGE si basa sull'elettroforesi di frammenti di DNA (come ad esempio regioni del gene 16S) precedentemente amplificati mediante PCR, su un gel di poliacrilammide contenente un gradiente crescente di sostanze denaturanti (urea e formammide).

La separazione dei frammenti (di uguale lunghezza e di dimensioni comprese tra 200 e 700 paia di basi) è basata sulla ridotta mobilità elettroforetica che hanno le molecole di DNA parzialmente denaturate rispetto al DNA a doppia elica. Migrando lungo il gel, i frammenti di dsDNA incontrano condizioni denaturanti sempre maggiori, fino a che esse non causano l'apertura del doppio filamento. La transizione da doppio filamento a filamenti parzialmente denaturati avviene in un range molto stretto; questo determina l'arresto della molecola sul gel in corrispondenza del suo specifico dominio di melting. Sequenze differenti hanno domini di melting differenti ed arresteranno la loro corsa in posizioni diverse sul gel. In questo modo è possibile separare frammenti di identica lunghezza, che differiscono per la sequenza di basi.

Talvolta i frammenti tendono però a denaturarsi completamente e non arrestano la loro corsa sul gel. Per ovviare a questo inconveniente, nella PCR che precede la DGGE, si utilizzano uno o più primers modificati con delle sequenze ricche in GC, dette GC-clamps. Le GC-clamps, lunghe circa quaranta basi, impediscono la completa denaturazione del frammento di DNA durante la corsa elettroforetica determinandone l'arresto sul gel.

Questa tecnica è stata impiegata per determinare la presenza e l'abbondanza relativa delle differenti specie e per ottenere un profilo sia qualitativo (presenza/assenza di bande) che semiquantitativo (intensità delle bande) delle comunità microbiche oggetto di studio.

### Lavoro sperimentale

Nella prima parte del lavoro si è proceduto all'ottimizzazione della tecnica di DGGE in funzione della sua applicabilità ai campioni di nostro interesse e permettere un corretto svolgimento dell'analisi. L'analisi DGGE è stata condotta con il sistema DCode™ Universal Mutation Detection System (BIO-RAD).

Il gel utilizzato è costituito da Acrilamide/Bis-acrilamide all' 8% con gradiente denaturante lineare composto da urea e formammide. L'assemblaggio (casting) del gel prevede: 1) una fase iniziale in cui si ottiene la polimerizzazione del gel, che contiene gli agenti denaturanti che formano il gradiente lineare, all'interno di due lastre di vetro e 2) una fase finale in cui viene colato tra i due vetri, sopra il gel di separazione, uno "stacking gel" (8% di Acrilamide/Bis-acrilamide) privo di agenti denaturanti, il quale permetterà al DNA di distribuirsi omogeneamente all'interno dei pozzetti e di iniziare la corsa in modo corretto.

Nella fase iniziale di ottimizzazione delle condizioni di corsa della DGGE, inizialmente è stato scelto un range di denaturazione compreso fra 0% e 100%, il quale ha permesso di osservare una prima distribuzione delle bande all'interno del gel e determinare aggiustamenti successivi al fine di migliorare la separazione delle bande dei campioni specifici utilizzati in questo studio.

Dopo varie prove "di aggiustamento" si è deciso di impiegare un range di denaturazione compreso fra 20% e 70% il quale appariva ottimale per discriminare con accuratezza la popolazione microbica di nostro interesse. Le nostre conclusioni, inerenti il gradiente da utilizzare, confermano, tra l'altro, quelle già rilevate in altri studi (Sekiguchi,2001; Tanahashi,2005; Sigler,2003; Watanabe 2002) indicanti che per batteri da campioni ambientali l'intervallo migliore di denaturazione è 30%-60%, 20%-70%.

Anche per quanto riguarda le condizioni di corsa elettroforetica è stata condotta un'accurata analisi bibliografica che ha portato a definire le seguenti condizioni; 5 h a 60 °C passando da un voltaggio di 20 V, mantenuto per i primi dieci minuti, a 200 V per le successive ore. Il buffer di corsa era TAE buffer 1X ().

Il gel veniva caricato con campioni ottenuti tramite estrazione di DNA e amplificazione PCR (Nested PCR) (vedi oltre).

Terminata la corsa, il gel veniva colorato tramite immersione (30 minuti al buio) in una soluzione di gelRed (Gelred Nucleic Acid Gel Stain,10.000X in water, Biotium), 200 ml, soluzione 3X in water 0,1M NaCl (1.36g NaCl, 66.7µl gelred, 200ml H<sub>2</sub>O).

La rilevazione delle bande avveniva tramite successiva osservazione al transilluminatore. Il gel veniva fotografato direttamente sul transilluminatore e le foto sottoposte ad analisi d'immagine.

La foto del gel veniva modificata tramite il programma d'immagine Adobe Photoshop CS5 con il quale l'immagine veniva convertita in bianco e nero, addezzata se necessario e veniva minimizzato il rumore di

fondo. Successivamente si procedeva all'analisi d'immagine mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3, un potente pacchetto software per l'analisi d'immagine di gel elettroforesi 1-D. Il Quantity one permette di analizzare una grande varietà di dati biologici, compresi quelli radioattivi, chemiluminescenza, fluorescenti e campioni acquisiti da densitometri e informazioni derivanti da differenti gel elettroforetici. Le varie funzioni possono essere utilizzate per determinare il peso molecolare, punti isoelettrico, VNTRs, presenza / assenza e regolamentazione delle bande, e altri valori. Il software è in grado di misurare quantitativi totali e media, determinare quantità relative e reali di proteine, e contare le colonie in piastre di Petri. Tramite questo software venivano individuate le lanes presenti nel gel e si evidenziavano in rosso le bande e la loro posizione stimando anche l'intensità di ogni singola banda rapportandola alla sua lane, intensità relativa o è possibile determinare l'intensità assoluta.

Nello step precedente l'amplificazione del DNA genomico estratto è effettuata come segue: è stata condotta una prima PCR (95°C x 7 min. per 25 cicli: 94°C x 1min. e 10 sec., 56°C x 40 sec., 72°C x 2 min., 72°C x 6 min. e 10 sec. mantenimento 4°C) per amplificare una porzione del gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S RNA degli eubatteri, utilizzando i primers rD1 e fD1.

-rD1:CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC.

-fD1:CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG.

I prodotti di questa prima amplificazione sono stati utilizzati come stampo per una successiva amplificazione (nested-PCR) (94°C x 7 min. per 20 cicli, con diminuzione di 0,5°C ogni ciclo passando da 65°C a 55°C: 94°C x 1 min., 65°C x 1 min., 72°C x 2 min. 10 cicli addizionali a temperatura costante a 55°C x 1 min. 72°C x 10 min. mantenimento 4°C) della porzione ipervariabile V3 con i primers 534 (R) e GC-341(F).

-534r:ATTACCGCGGCTGCTGG.

-GC341f:cgccccgccgcgcggcgggcgggcgggggcACGGGGGATCCCTACGGGAGGCAGCAG.

Come riportato in bibliografia (Muyzer,1993; Watanabe,2001; Watanabe,2002;Kawalchuk,1998), questa seconda PCR, che prevede nella temperatura di annealing una procedura di touchdown da 65°C a 55°C, permette di aumentare l'efficienza dell'amplificazione e aumentare la specificità dei primers nei confronti dello specifico DNA stampo.

Il primer dotato della coda CG, impedisce la completa denaturazione delle molecole di DNA durante la corsa elettroforetica determinando l'arresto sul gel in modo riproducibile e sequenza specifico.

Per ottenere dei campioni con un grado di purezza maggiore, è stata effettuata una purificazione mediante kit commerciali (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) e, successivamente, si è concentrato il DNA campione così da ottenere una migliore risoluzione e chiarezza delle bande sul gel di DGGE.

Successivamente alla DGGE si è proceduto all'ottimizzazione della procedura di estrazione delle singole bande. Sono state provate differenti metodiche al fine di individuare la più idonea per i nostri campioni. (Sckiguchi,2002; Muyzer,1996).

## Cronologia della sperimentazione.

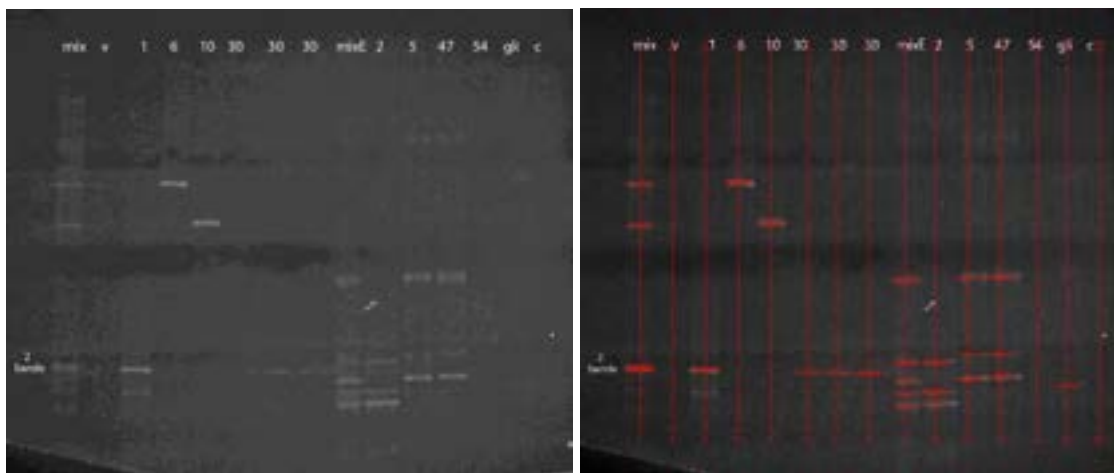
09/03/2011

Una prima DGGE è stata eseguita su un set di campioni misti appartenenti al laboratorio di Microbiologia Marina Applicata dell'Università della Tuscia di Viterbo e campioni forniti dall'agenzia Enea al fine di individuare i valori adeguati per i differenti parametri della tecnica e ottimizzarli per le successive prove. I campioni caricati sul gel erano costituiti da DNA genomico estratto da isolati nel laboratorio e appartenenti ad una collezione di batteri marini: BM1, BM6, BM10, BM30 e la mix formata da questi isolati(mix). Inoltre è stato fatto correre il DNA di una mix glicerolo denominata "Glicerolo 250a" fornita dall'ENEA e il DNA di isolati appartenenti alla mix soprannominata "mix insalata": ceppo E2, E5, E47, E54 e la mix formata dai ceppi stessi(mixE).

Il range di denaturazione scelto è stato 30%-70%. Corsa: 200V x 5 ore, 60°C.

Risulta interessante osservare come in Fig.1A, la prima lane contenga 4 bande di cui due nettamente separate l'una dall'altra e due molto vicine, quasi identificabili come un'unica banda. Ciò può indicare che questi ultimi DNA abbiano una sequenza della regione V3 molto simile e quindi un punto di denaturazione prossimo l'uno all'altro. Questo lo si può ulteriormente evidenziare sul gel nella lane 3 con il campione 1e la lane 6 con il campione 30 dove i campioni si posizionano alla stessa altezza.

Inoltre il campione 30 è stato inserito in triplicato all'interno della prova per osservare se vi fosse ripetibilità nella migrazione del DNA e nel posizionamento dello stesso all'interno del gradiente chimico.



A

B

Fig.1

A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA di campioni batterici.

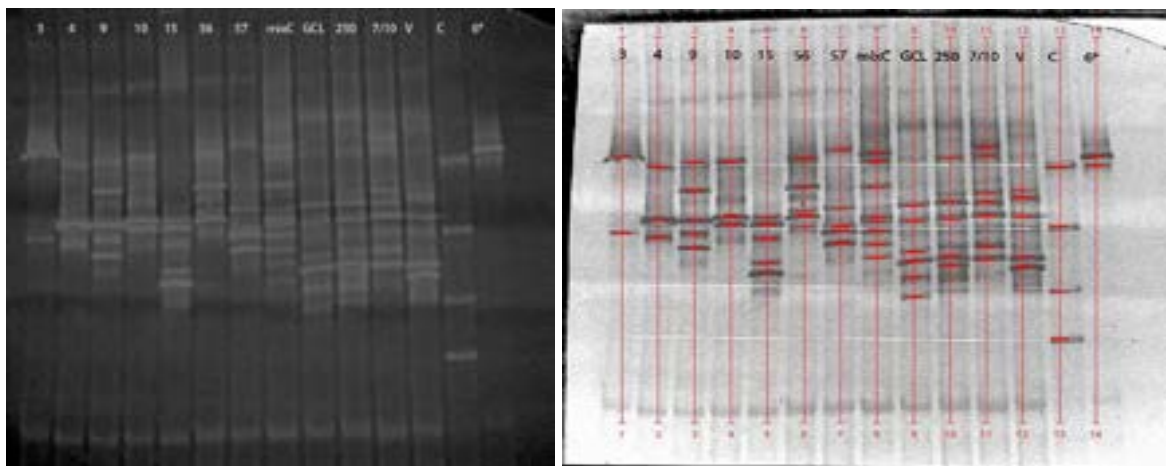
LANE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CAMPIONE	Mix BM	Vuoto (v)	BM 1	BM 6	BM 10	BM 30	BM 30	BM 30	Mix E	E 2	E 5	E 47	E 54	Gli 250a	Controllo (c)

B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (15 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

14/04/2011

E' stata condotta una DGGE su campioni forniti da ENEA costituiti da isolati della mix -insalata: E3, E4, E9, E10, E15, E56, E57 e la mix formata da questi isolati (mixC). Una mix glicerolo (GCL), la mix glicerolo 250a (250), la mix glicerolo 7/10 (7/10) e un campione scelto tra i batteri marini presenti nella collezione del laboratorio di Microbiologia (BM6\*).

I parametri scelti sono stati: gradiente di denaturazione 20%-70%; corsa a 200V x 5 ore a 60°C.



A

B

Fig.2

A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA di campioni batterici.

LANE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CAMPIONE	E 3	E 4	E 9	E 10	E 15	E 56	E 57	mixC	GCL	250a	7/10	Vuoto (v)	Controllo (c)	BM 6*

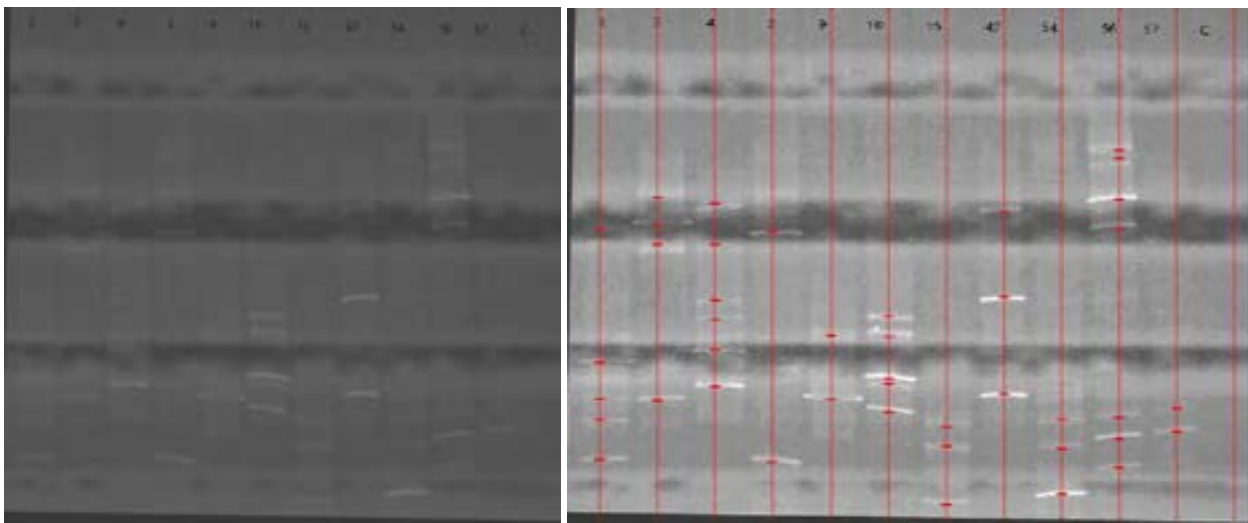
B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (14 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

28/04/2011

E' stata allestita una DGGE di tutti gli isolati ENEA che costituiscono la "mix insalata": E2, EE3, E4, E5, E9, E10, E15, E47, EE54, 56, E57. Range di denaturazione scelto è stato 25%-60% con la corsa a 200V x 5 ore a 60°C.

Come è possibile osservare dalla Fig.3A e successivamente confermato anche dall'analisi mediante il software Quantity one (Fig.3B), i singoli campioni apparentemente derivanti da colture pure, contengono più bande per lane lasciando supporre che forse vi siano problemi nella corsa del gel con formazione di

eteroduplex e omoduplex dovuti a cause differenti (Nubel,1996 ; Kowalchuk,1997; Muyzer et Smalla,1997 Sekiguchi,2001), o campioni misti, non puri, con DNA appartenente a ceppi differenti.



A

B

*Fig.3*

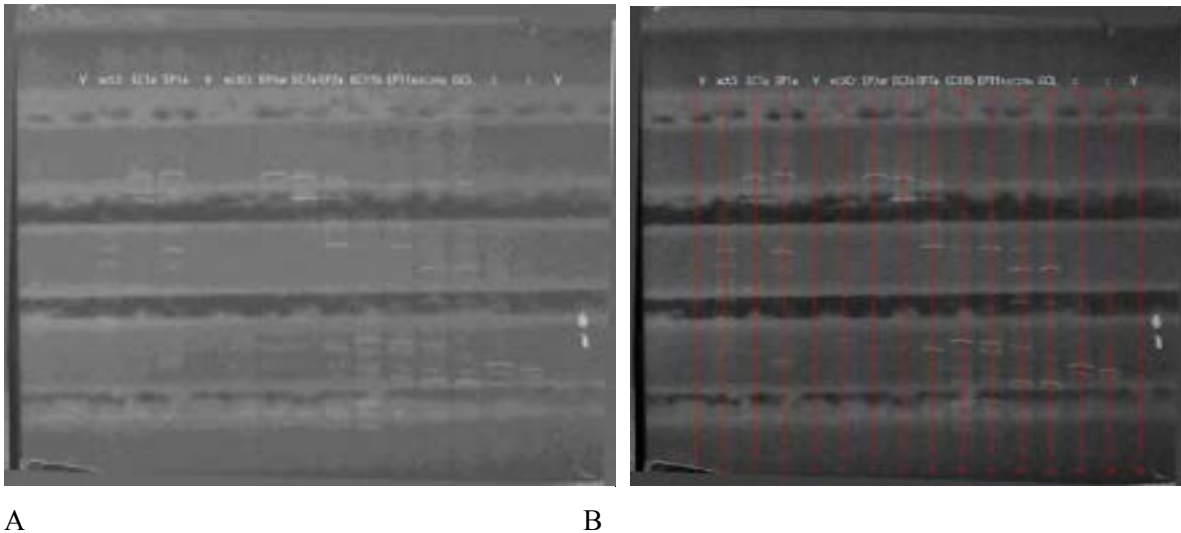
A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA degli isolati batterici che costituiscono la mix insalata.

<i>LANE</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<i>CAMPIONE</i>	Vuoto (v)	E 2	E 3	E 4	E 5	E 9	E 10	E 15	E 47	E 54	E 56	E 57	Controllo (c)

B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (12 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

17/06/2011

È stata condotta una DGGE su campioni forniti dall'agenzia ENEA costituiti da differenti mix glicerolo ottenuti da successivi arricchimenti. I campioni erano denominati: mix Activ. Sludge, mix EC1a, mix EP1a, mix EC3c riatt., mix EP3c riatt., mix EC7a, mix EP7a, mix EC 11b, mix EP 11a, mix EC 250a, mix GCL. I parametri utilizzati per questa DGGE erano un gradiente di denaturazione 20%-70% e una corsa a 200Vx 5 ore, 60°C.



*Fig.4*

A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA dei batteri costituenti la mix glicerolo in tempi differenti e dopo successivi arricchimenti.

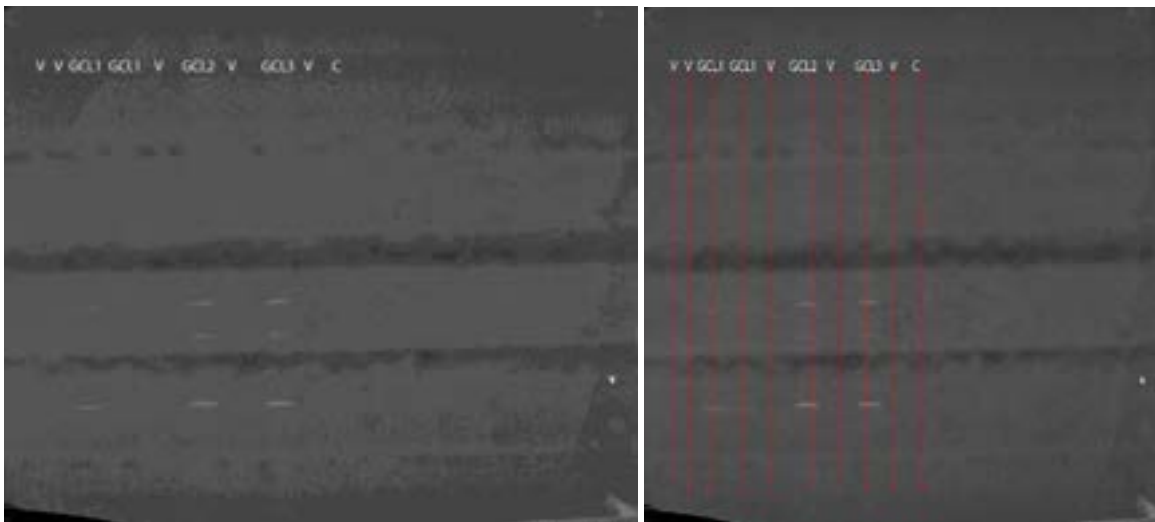
<i>LANE</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>CAMPIONE</i>	Vuoto (v)	Act.s	EC1a	EP1a	vuoto (v)	EC3 cr	EP3c r	EC7a	EP7 a	EC 11b	EP 11a	EC 250a	GCL	Controllo (c)	(c)	(c)

B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (16 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

22/06/2011

Una DGGE della sola mix GCL è stata allestita per poter osservare sia la ripetibilità della disposizione delle bande all'interno del gradiente chimico del gel sia per poter prelevare le bande e successivamente sequenziarle per ottenere informazioni sui ceppi che costituiscono tale mix. Sul gel è stato caricato il DNA della stessa mix e denominato: GCL1, GCL1, GCL2, GCL3.

Il gradiente di denaturazione scelto è stato 20%-70% e la corsa 200V x 5 ore a 60°C.



A

B

*Fig.5*

A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA dei batteri che costituiscono la mix glicerolo.

LANE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CAMPIONE	Vuoto (v)	(v)	GCL1	GCL1	(v)	GCL2	(v)	GCL3	(v)	Controllo (c)

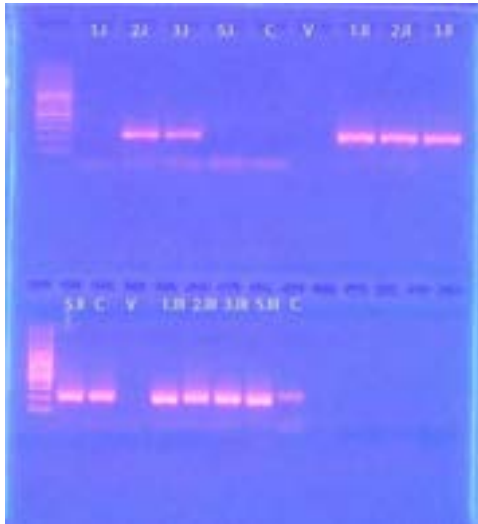
B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (10 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

Da questo gel sono state estratte le bande (mediante tre differenti metodi) a cui è seguita una nuova amplificazione per il sequenziamento. Sono riportate tre differenti metodiche di estrazione del DNA dal gel di Acrylamide/Bis-acrylamide, di cui il metodo II e III sono risultati essere i più adatti con risultati visibili in figura 6 (Fig.6).

Nel I metodo, il gel viene posizionato sul transilluminatore e la banda viene estratta con una pipetta con puntale sterile che preleva il DNA bloccato nelle maglie del gel. Come è possibile osservare in fig.6 le bande 1 e 4 non sono state ri-amplificate indicando forse che non è stata prelevata una quantità adeguata di DNA, mentre nelle bande 2 e 3 c'è stata una buona ri-amplificazione.

Nel II metodo, le bande sono tagliate con un bisturi e incubate a 4°C per tutta la notte in una eppendorf con 100µl di buffer TE (Sekiguchi et al.;2002) La ri-amplificazione è avvenuta correttamente (fig.6).

Nel III metodo, le bande sono tagliate con un bisturi e messe in agitazione per 3 min. in una eppendorf con 500 µl H<sub>2</sub>O e biglie di vetro. Lasciare a 4°C per tutta la notte e successivamente centrifugare a bassa velocità per separare il DNA dalle biglie e dal gel (Muyzer;1996). Anche in questo caso la ri-amplificazione è avvenuta correttamente.



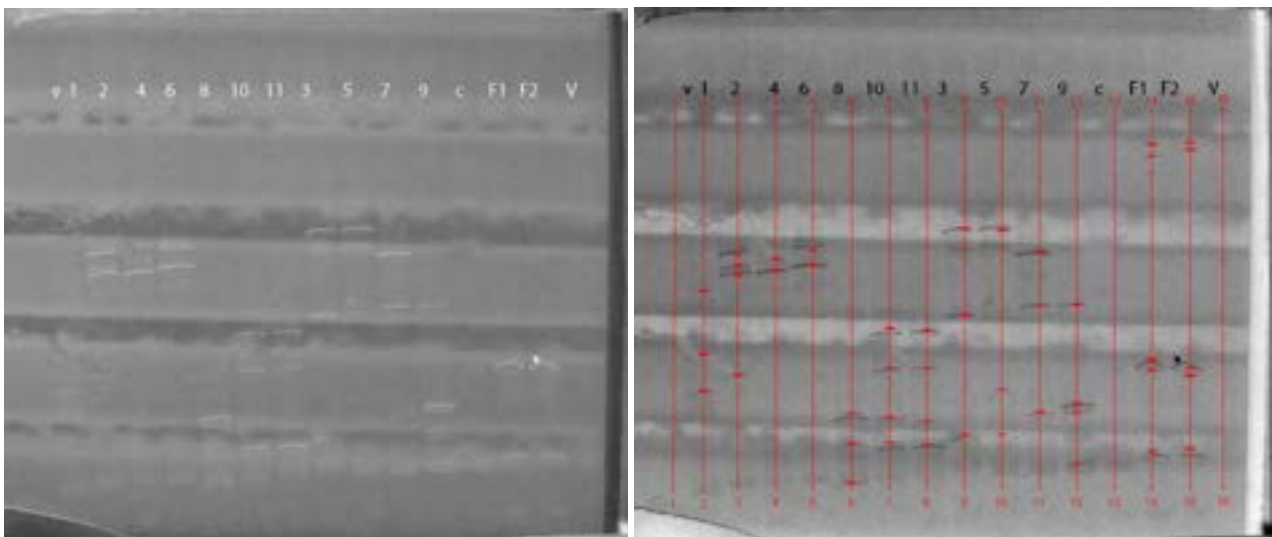
**Fig.6**

Elettroforesi su gel di agarosio all'1% del prodotto di ri-amplificazione delle bande estratte dal gel di DGGE del campione GCL. Sono riportati i risultati delle tre metodiche utilizzate e le bande estratte: 1.I, 2.I, 3.I, 5.I; 1.II, 2.II, 3.II, 5.II, 1.III, 2.III, 3.III, 5.III,

29/06/2011

La DGGE qui riportata è stata condotta su campioni ENEA costituiti da mix glicerolo e della mix "Fogliano", messa in doppio per confermare la posizione delle bande all'interno del gradiente chimico. Le mix sul gel sono: mix Activ.Sludge, mix EC1a, mix EP1a, mix EC3c riatt., mix EP3c riatt., mix EC7a, mix EP7a, mix EC 11b, mix EP 11a, mix EC 250a, mix GCL, mix Fogliano1, mix Fogliano2.

Il gradiente di denaturazione scelto è stato 20%-70% e la corsa a 200V x 5 ore a 60°C.



A

B

**Fig.7**

A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA dei batteri costituenti la mix glicerolo in tempi differenti e dopo successivi arricchimenti. La mix Fogliano è stata inserita nel gel in doppio (F1 e F2).

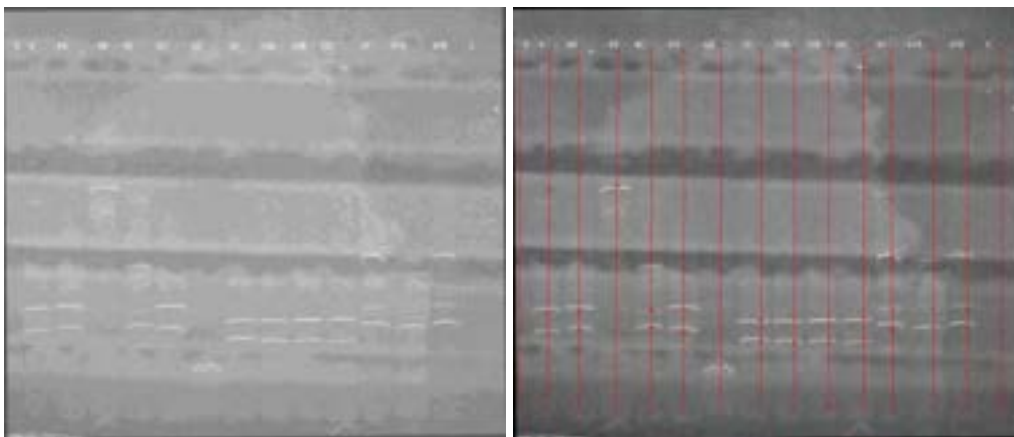
<i>LANE</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<i>CAMPIONE</i>	Vuoto (v)	1 Act.sld.	2 EC1a	4 EC3c	6 EC7a	8 EC11b	10 EC250a	11 GCL	3 Ep1a	5 EP3a	7 EP7a	9 EP11a	(c)	F1	F2	(v)

B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (10 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

05/09/2011

E' stata allestita una DGGE dei campioni ENEA 4, 10, 47 conservati in glicerolo, che costituiscono parte della mix-insalata, i quali in una DGGE precedente avevano mostrato più di una banda all'interno della lane e avevano lasciato ipotizzare che si trattasse di colture non pure. Inoltre è stato fatto correre sullo stesso gel il DNA degli isolati ottenuti da tali campioni mediante tecniche di isolamento: 4A, 4B, 4C, 4D, 4Z; 10A, 10B, 10C; 47A, 47B.

Il gradiente di denaturazione scelto è stato 20%-70% e la corsa è avvenuta a 200V x 5 ore, 60°C.



A

B

*Fig. 8*

A) Profilo DGGE della regione V3 del 16s rDNA dei campioni 4, 10, 47 facenti parte della mix Insalata e degli isolati batterici da essi ottenuti mediante diluizioni e isolamenti progressivi.

<i>LANE</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>CAMPIONE</i>	Vuoto (v)	4	4A	4B	4C	4D	4Z	10	10A	10B	10C	47	47A	47B	(C)

B) Foto del gel di DGGE analizzato mediante il software Quantity one 1-D analysis software version 4.6.3. Nella foto sono evidenziate le lanes presenti nel gel (15 lanes) e in ogni lane sono evidenziate in rosso le bande e le loro posizioni.

## ISOLAMENTO CEPPI DELLA MIX INSALATA

Attraverso la DGGE effettuata il 28/04/2011 in cui sono stati caricati gli isolati che costituiscono la mix-insalata è stato possibile osservare come tali campioni non sembrano essere puri. La corsa di DGGE ha evidenziato che ogni singolo isolato contiene due o più bande, lasciando ipotizzare che in ogni campione da cui è stato estratto il DNA non vi sia un solo ceppo.

La presenza di più bande all'interno di una coltura pura può avere origini differenti e non essere necessariamente attribuita a contaminazioni del campione. Sono possibili fenomeni di eterogenicità (Nubel,1996), o episodi in cui all'interno di una singola specie si verificano puntiformi mutazioni che causano piccole variazioni nella sequenza target scelta per la DGGE dando quindi due bande distinte nel gel. La DGGE nasce come tecnica per lo studio della mutagenesi ed è in grado di separare due DNA che differiscono per una singola coppia di basi (Myers,1985; Muyzer,1993).

Altre possibili cause possono essere attribuite alla presenza di DNA eteroduplex che per differenti cause, ad esempio un' alta concentrazione del DNA target, non è stato in grado di denaturarsi e nel gel evidenzia una banda differente dal suo compagno omoduplex (Nicolaisen,2002).

Come riportato in bibliografia (Muyzer et Smalla,1998) una specie, coltura pura, può avere fino a 10 bande se il DNA utilizzato come target per svolgere la DGGE è il gene del 16s rRNA.

Si è proceduto di ad un isolamento dei ceppi, con metodi colturali tramite strisci su piastra, così da poter verificare la purezza delle colture o ottenere nuovamente campioni puri se tali ceppi risultavano contaminati. Il lavoro è stato condotto su isolati conservati in glicerolo a -80°C.

Gli strisci hanno evidenziato la presenza di più colonie di aspetto differente, questo è stato confermato anche con la tecnica di disseminazione.

Sono state fatte differenti diluizioni:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , le quali hanno evidenziato in alcuni campioni la presenza di più colonie per piastra e confermato l'ipotesi della contaminazione.

Le diluizioni sono state fatte sul terreno piante count agar (PCA) il quale è stato anche utilizzato per coltura dei vari isolati.

Da ogni ceppo potenzialmente contaminato sono state isolate varie colonie sulle quali sono stati condotti una serie di test chimico-biologici (colorazione di Gram, test del KOH, test della catalasi) al fine di capire possibili differenze tra le colonie stesse (tabella 1).

Inoltre è stata osservata la morfologia delle varie colonie isolate al fine di confrontarle con le informazioni trovate in bibliografia relative all'aspetto delle colonie che realmente dovrebbero rappresentare i microrganismi contenuti nei campioni.

Successivamente è stato estratto il DNA dalle singole colonie e sono state fatte due PCR per amplificare il gene 16s rDNA e la regione V3. I campioni di DNA così ottenuti saranno utilizzati per una nuova DGGE.

Ceppo 10

CEPPO 4

CEPPO 54



A

B

C

CEPPO 56

CEPPO 57

CEPPO 47



D

E

F

**Fig. 9**

Piastre con terreno PCA ottenute da successive diluizioni degli isolati: 10, 4, 54, 56, 57,47 che costituiscono parte della mix insalata. Ogni piastra contiene più colonie con morfologia e struttura differenti.

<i>CAMPIONE</i>	<i>GRAM</i>	<i>KOH</i>	<i>CATALASI</i>	<i>MORFOLOGIA COLONIA</i>
<b>4A</b>	-	-	-	Giallastra, margini irregolari, poco viscosa.
<b>4B</b>	+	+	-	Bianca, circolare puntiforme.
<b>4C</b>	-	-	+	Giallastra-bianca, margini regolari, viscosa.
<b>4D</b>	-	-	+	Giallastra—traslucida, margini irregolari, non viscosa.
<b>4Z</b>	+	+	+	Biancastra-trasparente, filamentosa (simile attinomicete).
<b>10A</b>	-	-	+	Giallastra-biancastra, molto viscosa, margini regolari.
<b>10B</b>	-	-	+	Giallastra-biancastra, molto viscosa, margini regolari.
<b>10C</b>	-	-	+	Biancastra, margini regolari, circolare.
<b>47A</b>	-	-	+	Giallo chiaro, viscosa.
<b>47B</b>	-	-	+	Giallo chiaro, viscosa
<b>54A</b>	-	-	+	Giallastra-trasparente, piatta, marg. irregolare.
<b>54B</b>	-	-	+	Bianca, viscosa, margini regolari, circolare regolare.
<b>54C</b>	-	-	+	Bianca, viscosa, margini regolari, circolare regolare.
<b>56A</b>	-	-	+	Giallastra-traslucida, piatta, margini irregolari e più chiari.
<b>56B</b>	-	-	+	Bianca, puntiforme.
<b>56C</b>	+	+	-	Giallo-biancastra, viscosa, margini regolari, regolare.
<b>57A</b>	-	-	+	Gialla-traslucida, piatta margini irregolari, più chiari.
<b>57B</b>	+	+	+	Bianca,puntiforme.

**Tab.1**

Caratteristiche biochimiche e morfologiche studiate per gli isolati 4, 10, 47, 54, 56, 57.