

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

**Ecologia Microbica e Resistenza Indotta agli Agenti
Fitopatogeni**

Ciclo XXI

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: AGR/16

**Rapporti fra fattori ambientali e proteine di
parete in *Bifidobacterium***

Presentata da: Stefano Tacconi

Coordinatore Dottorato

**Prof. Paolo Bertolini
Biavati**

Relatore

Prof. Bruno

Esame finale anno 2009

Abstract

The normal gut microbiota has several important functions in host physiology and metabolism, and plays a key role in health and disease. Bifidobacteria, which are indigenous components of gastrointestinal microbiota, may play an important role in maintaining the well-being of the host although its precise function is very difficult to study. Its physiological and biochemical activities are controlled by many factors, particularly diet and environment.

Adherence and colonization capacity are considered as contributing factors for immune modulation,

pathogen exclusion, and enhanced contact with the mucosa. In this way, bifidobacteria would fortify the microbiota that forms an integral part of the mucosal barrier and colonization resistance against pathogens.

Bifidobacteria are not only subjected to stressful conditions in industrial processes, but also in nature, where the ability to respond quickly to stress is essential for survival. Bifidobacteria, like other microorganisms, have evolved sensing systems for/and defences against stress that allow them to withstand harsh conditions and sudden environmental changes.

Bacterial stress responses rely on the coordinated expression of genes that alter various cellular processes and structures (e.g. DNA metabolism, housekeeping genes, cell-wall proteins, membrane composition) and act in concert to improve bacterial stress tolerance. The integration of these stress responses is accomplished by regulatory networks that allow the cell to react rapidly to various and sometimes complex environmental changes. This work examined the effect of important stressful conditions, such as changing pH and osmolarity, on the biosynthesis of cell wall proteins in *B. pseudolongum* subsp. *globosum*. These environmental factors all influence heavily the expression of BIFOP (BIFidobacterial Outer Proteins) in the cell-wall and can have an impact in the interaction with host. Also evidence has been collected linking the low concentration of sugar in the culture medium with the presence or absence of extracromosomal DNA.

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1		PAG.
IL MICROBIOTA INTESTINALE		2
1.1	LA BIODIVERSITÀ DEL MICROBIOTA INTESTINALE	3
1.2	COLONIZZAZIONE DEL TRATTO	3
GASTROINTESTINALE DELL'UOMO		
1.3	ATTIVITÀ FUNZIONALE DEL MICROBIOTA	7
1.3.1	Funzioni metaboliche	7
1.3.2	Funzione protettiva del microbiota intestinale	10
1.3.2.1	Inibizione dei patogeni	10
1.3.2.2	Effetto protettivo sulle malattie intestinali [intestinal bowel disease (IBD)] e nervose	11
CAPITOLO 2		
IL GENERE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>		14
2.1	EVOLUZIONE DEGLI STUDI SUL GENERE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	14
2.2	Biologia del genere <i>Bifidobacterium</i>	15
2.2.1	Caratteri morfologici	18
2.2.2	Composizione della parete	19
2.2.3	La membrana citoplasmatica	20
2.2.4	Struttura del citoplasma	20
2.3	CARATTERISTICHE FISIOLOGICHE	21
2.3.1	Temperatura e pH	21
2.3.2	Sensibilità all'ossigeno	21
2.3.3	Agenti antimicrobici (antibiotici e oli essenziali)	21
2.4	METABOLISMO	22

2.4.1	Fermentazione del glucosio	22
2.4.2	Fermentazione di carboidrati semplici, complessi e mucine	24
2.4.3	Enzimi	25
2.4.4	Fisiologia e metabolismo	27
2.4.5	Caratteristiche nutrizionali	28
2.4.6	Terreni di coltura	29
2.5	CARATTERISTICHE DEL GENOMA	30
2.5.1	Composizione delle basi del DNA	30
2.5.2	Ibridazione DNA-DNA	30
2.5.3	Plasmidi	31
2.6	ECOLOGIA	31
2.6.1.	Habitat umano	32
2.6.2	Habitat animale e extracorporeo	33
2.7	SPECIE PROBIOTICHE	34
CAPITOLO 3		
	CARATTERISTICHE DELLA SPECIE OGGETTO DI STUDIO	37
3.1.	<i>BIFIDOBACTERIUM PSEUDOLONGUM</i> SUBSP. <i>GLOBOSUM</i>	37
CAPITOLO 4		
	L'ADESIONE MICROBICA	40
4.1	MECCANISMO GENERALE DELL'ADESIONE	40
4.2	MACROMOLECOLE DI SUPERFICIE COINVOLTE NELL'ADESIONE	42
4.3	LIGANDI DI SUPERFICIE NEI BIFIDOBATTERI	43
4.4	EFFETTO DELLE CONDIZIONI AMBIENTALI SULL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE	45
CAPITOLO 5		
	I PROBIOTICI	48
5.1	IL TERMINE "PROBIOTICO"	48
5.2	EFFETTI BENEFICI DEI PROBIOTICI	50
CAPITOLO 6		

MATERIALI E METODI	54
6.1 CEPPI UTILIZZATI	54
6.2. TERRENI DI COLTURA	54
6.3 CONDIZIONI DI INCUBAZIONE	54
6.4 CONSERVAZIONE DELLE COLTURE	54
6.5 DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA	56
6.6 CRESCITA ALLE DIVERSE CONDIZIONI AMBIENTALI	56
6.6.1 Coltura a pH costante	55
6.6.2 Coltura in NaCl.	56
6.6.3 Coltura in TPY diluito	56
6.6.4 Coltura in Desferal	56
6.6.5 Coltura a diverse concentrazioni di glucosio.	56
6.6.6 Coltura in diversi zuccheri	57
6.7 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI CELLULARI TOTALI, DEGLI ESTRATTI CELLULARI CITOPLASMATICI E DELLE PARETI CELLULARI.	57
6.8 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLE PROTEINE	57
6.9 ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE IN GRADIENTE LINEARE (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).	59
6.10 TRASFERIMENTO SU FILTRI DI NITROCELLULOSA	59
6.11 PREPARAZIONE DEGLI ANTISIERI POLICLONALI (ANTICORPI II)	59
6.12 ANALISI IMMUNOLOGICA DELLE PROTEINE BLOTTATE.	60
6.13 SAGGI DI IDROFOBICITÀ	60
6.14 TRATTAMENTO CON TRIPSINA	61
6.15 ELETTROFORESI DELLE PROTEINE NATIVE:	62
CAPITOLO 7	
RISULTATI E DISCUSSIONE	65
7.1 Coltura a pH costante	65
7.1.1 Effetto pH sulle BIFOP C e H	65

7.1.2	Prove di idrofobicità a diversi pH	68
7.2	Coltura in NaCl	68
7.2.1	Effetto NaCl sullo sviluppo di Ru 809/1 e Ru 809/8.	68
7.2.2	Effetto NaCl sulle proteine di parete	69
7.2.3	Effetto NaCl sull'idrofobicità	73
7.3	Coltura in TPY diluito	73
7.4	Coltura in Desferal	73
7.5	Coltura in diversi zuccheri.	74
7.5.1	Effetto della coltura in diversi zuccheri sull'espressione delle BIFIOP C e H.	74
7.5.2	Effetto coltura in diversi zuccheri sull'idrofobicità	81
7.5.2	Effetto trispsina sulle cellule maggiormente idrofobiche coltivate nei diversi zuccheri	81
7.6	Coltura a diverse concentrazioni di glucosio	82
7.8	Coltura alle condizioni ambientali che inducono la maggior espressione quantitativa di BIFOP C e H (prova MWP, Maximum Wheight Protein)	86
7.8.1	Effetto della somma delle condizioni ambientali che inducono overespressione delle BIFOP C e H sull'espressione delle BIFOP C e H.	86
7.8.2	Prove di idrofobicità MWP	89
7.9	Effetto condizioni colturali su mantenimento plasmide	90
7.10	Effetto concentrazione dello 0.15 % di diversi zuccheri sul mantenimento del plasmide.	90
7.11	CONCLUSIONI	91
	BIBLIOGRAFIA	93

CAPITOLO 1

IL MICROBIOTA INTESTINALE

1.2 LA BIODIVERSITÀ DEL MICROBIOTA INTESTINALE

Il grande intestino ospita un microbiota che comprende centinaia di diversi tipi di batteri. Le nostre conoscenze sulla sua struttura e funzione sono drasticamente cambiate nell'ultimo decennio, soprattutto a causa dell'introduzione dei metodi molecolari per lo studio delle comunità microbiche. Stime attuali, basate sulla sequenza dei geni del 16S rRNA nel DNA estratto da feci, indicano che sono presenti 800–1000 diverse specie microbiche e circa un numero >7000 di diversi ceppi (Backhead et al., 2005) e che la maggioranza di questi (>80%) non è stato ancora isolato o caratterizzato (Eckburg et al., 2005). Inoltre è presente un'ampia biodiversità microbica con funzioni sconosciute che deve essere studiata.

Sebbene il microbiota intestinale sembri stabile a lungo termine ed ampiamente simile in diversi individui, significative differenze possono essere rilevate a livello di specie e ceppi mentre una grande variabilità può verificarsi di giorno in giorno in alcune popolazioni microbiche. I fattori ecologici che controllano le attività metaboliche e la composizione del microbiota sono ben conosciuti. E' noto, per esempio, che un'elevata biodiversità di specie è necessaria per il mantenimento dell'omeostasi e per la stabilità strutturale della comunità microbica: la diminuzione delle specie microbiche a causa di un trattamento antibiotico o dell'età diminuisce la capacità dell'ecosistema di "opporsi" ai microrganismi patogeni (Jernberg et al., 2007). Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che la composizione del microbiota è legata a malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale (Peterson et al., 2008), come il morbo di Chron (Dicksved et al., 2008), e può influenzare la propensione all'obesità (Ley et al., 2006).

Il ruolo chiave del microbiota nella salute dell'ospite, pertanto, è stato confermato largamente nel corso degli ultimi anni. La comunità del microbiota dell'intestino influenza numerosi processi biologici come la maturazione dell'intestino e l'angiogenesi (Stappenbeck et al., 2002), lo sviluppo della immunità innata e innata immunity (Mazmanian et al., 2005), la produzione di vitamine (Hill, 1997), la biotrasformazione di composti esogeni ed endogeni (Blaut and Clavel, 2007), dietary

energy harvest, and recently, regulation of the host fat storage (Bäckhed et al., 2004). Particolare interesse è attribuito allo studio dell'influenza della dieta sia sulla composizione sia sul metabolismo del microbiota intestinale. La trasformazione di composti della dieta da parte dei batteri intestinali determina la formazione di una ampia varietà di composti con effetti positivi o negativi sulla salute dell'ospite. Una dieta ricca di carboidrati può avere un effetto significativo sul numero dei batteri che producono butirrato come *Ruminococcus/Faecalibacterium* and *Roseburia/Eubacterium*. Il butirrato è la sorgente energetica preferita per le cellule epiteliali del colon e si suppone che svolga un importante ruolo nel mantenimento della salute del colon attivando l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare (Roediger, 1982; Heerdt et al., 1994). Le fibre non digeribili, inoltre, possono stimolare selettivamente la crescita dei bifido batteri che svolgono effetti benefici per la salute (Lee et al., 1993; Gibson and Wang, 1994; Jiang et al., 1996; Schiffrin et al., 1995; Singh et al., 1997; Marteau et al., 2002; Rayment et al., 2002). Plant lignans e flavonoidi, generalmente considerate sostanze non nutritive, possono essere trasformati dai batteri intestinali in composti simili agli estrogeni con effetti antiossidanti. Ad esempio, l'attività di degradazione dei lignani è stata attribuita a ceppi dei generi *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eggerthella*, *Eubacterium*, and *Ruminococcus* isolati dalle feci (Blaut and Clavel, 2007).

1.2 COLONIZZAZIONE DEL TRATTO GASTROINTESTINALE DELL'UOMO

La composizione della normale flora del tratto gastrointestinale dell'uomo è influenzata da diversi fattori (età, sesso, dieta, temperatura) ed è stato sperimentalmente dimostrato che alcune specie batteriche possono essere regolarmente presenti, mentre altre possono comparire solo occasionalmente o in alcune fasi della vita (Stark *et al.*, 1982).

Alla nascita il canale digerente è sterile, ma viene rapidamente colonizzato da numerosi microrganismi provenienti sia dal microbiota fecale e vaginale materno, che dall'ambiente (Zoetendal *et al.*, 2001; Fanaro *et al.*, 2003; Woodmansey et al., 2004). La colonizzazione microbica incomincia fin dalle prime ore di vita ed è caratterizzata da una regolare successione di specie. (Figura 1)

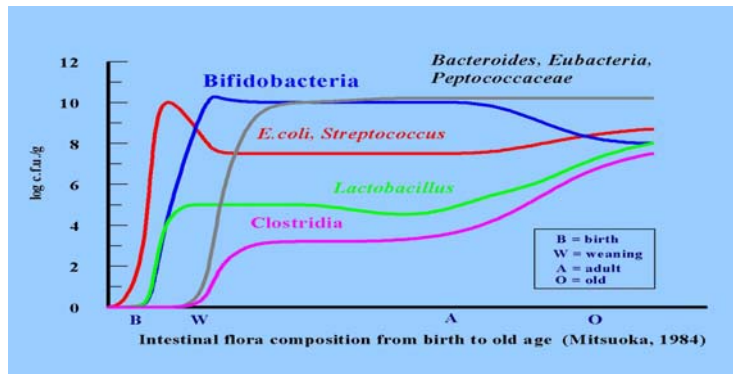


Figura 1: Rappresentazione della variazione quantitativa nel tempo dei principali gruppi microbici intestinali.

Lo stomaco dell'uomo è la porzione del tratto gastrointestinale meno colonizzata (10^1 - 10^3 CFU/ml), a causa del pH estremamente acido che lo caratterizza. Le specie fino ad ora isolate sono state *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus* spp., e *Streptococcus* spp. (Brandi et al., 2006).

Allo stomaco segue l'intestino tenue che è suddiviso in tre parti: duodeno, digiuno ed ileo ed è rivestito da una mucosa sollevata in estroflessioni, note come villi intestinali. A causa dell'azione combinata dei succhi gastrici e della bile, il duodeno contiene pochi microrganismi, mentre nel digiuno e nell'ileo il loro numero aumenta (10^4 - 10^8 CFU/ml). I generi microbici che sono stati isolati fino ad ora nel digiuno e nell'ileo dell'uomo sono specie appartenenti ai generi *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e coliformi (Simon and Ghorbac, 1984; Guarner and Malagelada, 2003).

All'intestino tenue segue l'intestino crasso, che è un lungo tubo suddiviso in cieco (rappresentato da una breve espansione terminante nell'appendice vermiforme) colon e retto, la cui mucosa è solitamente più spessa di quella dell'intestino tenue, priva di villi ed è la porzione di tratto gastrointestinale maggiormente colonizzata.

Entro le prime ore di vita, il colon contiene circa 10^3 - 10^4 CFU/g, rappresentate prevalentemente da specie appartenenti ai generi *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides*, *Eubacterium* spp., *Peptococcus* ed *E.coli* (Aggett et al., 2003; Ward et al., 2006). Già durante la prima settimana di vita il numero dei microrganismi aumenta fino a 10^9 CFU/g, ed è rappresentato da specie microbiche

diverse nei neonati allattati al seno o con latte artificiale (Biavati *et al.*, 1985). Nei neonati allattati al seno, infatti, si osserva un precoce insediamento di *E. coli* e *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp., ma già dopo 2-5 giorni i bifidobatteri prendono il sopravvento e, secondo la maggior parte dei ricercatori, il loro insediamento avviene attraverso la vagina della madre l'ambiente circostante anche se recenti studi hanno messo in evidenza la presenza di bifido batteri nella ghiandola mammaria e nel latte materno (Martin *et al.*, 2009; Liepke *et al.*, 2002). Dopo la prima settimana di vita la microflora di questi neonati è costituita prevalentemente da bifidobatteri, che divengono i microrganismi predominanti nella flora fecale (Favier *et al.*, 2002; Penders *et al.*, 2006), forse perchè il latte umano contiene fattori indispensabili per il loro sviluppo (Liepke *et al.*, 2002; Grönlund *et al.*, 2007; Gueimonde *et al.*, 2007). Le specie appartenenti ai generi *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp, *E.coli* ed altri anaerobi sono regolarmente presenti, seppur in proporzioni minori, mentre *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Clostridium* spp. e *Peptococcus* spp. sono praticamente assenti.

Nei neonati alimentati con latti diversi, la microflora risulta più diversificata ed accanto ad *E.coli* si trovano *Streptococcus* spp. ed altri anaerobi stretti in proporzioni molto maggiori che non nei neonati allattati al seno, *Bifidobacterium* spp. è presente in proporzioni uguali o solo leggermente inferiori e solo *Lactobacillus* spp. è presente in proporzioni molto minore (Hopkins *et al.*, 2005; Penders *et al.*, 2005) (Fig. 2).

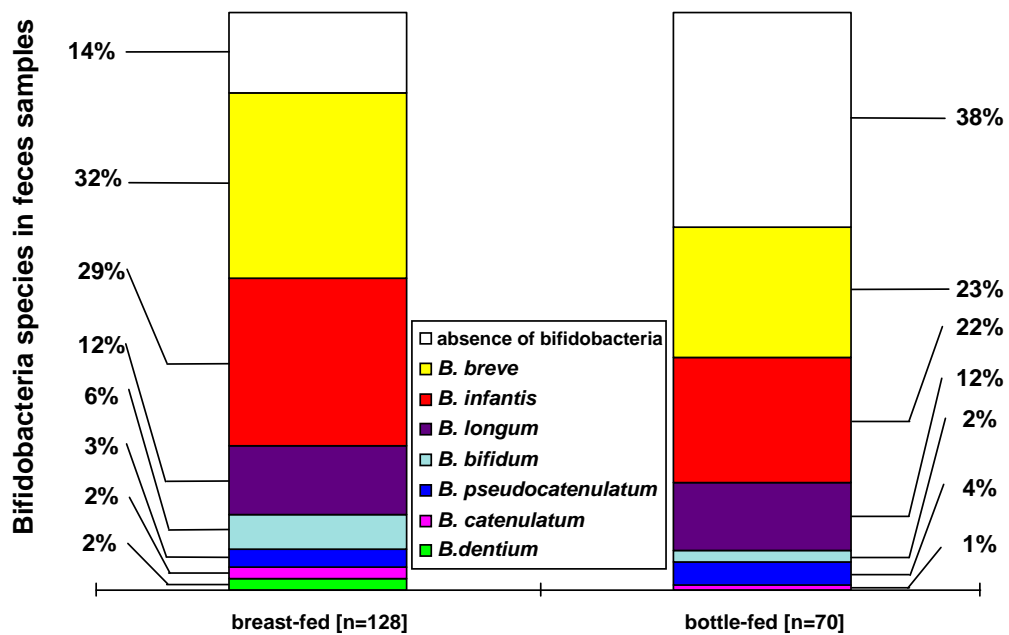


Fig. 2. Distribuzione delle specie di bifidobatteri nelle feci di neonati allattati al seno ed artificialmente. Dati da Biavati et al., 1986.

Dopo lo svezzamento (circa attorno ai due anni di vita) la flora fecale cambia per l'assunzione di cibi solidi ed assume le caratteristiche di quella dell'adulto in cui diminuiscono i batteri anaerobi facoltativi ed aumentano progressivamente gli anaerobi stretti (Tannock, 1999). In questa fase della vita, infatti, *E.coli* e *Streptococcus* spp. diminuiscono molto e raggiungono un livello che si mantiene poi costante nell'adulto, i bifidobatteri ed i lattobacilli subiscono solo una leggera flessione, mentre *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Clostridium perfringens* compaiono solo in questa fase ed aumentano progressivamente di numero (Benno et al., 1984) (Fig. 3)

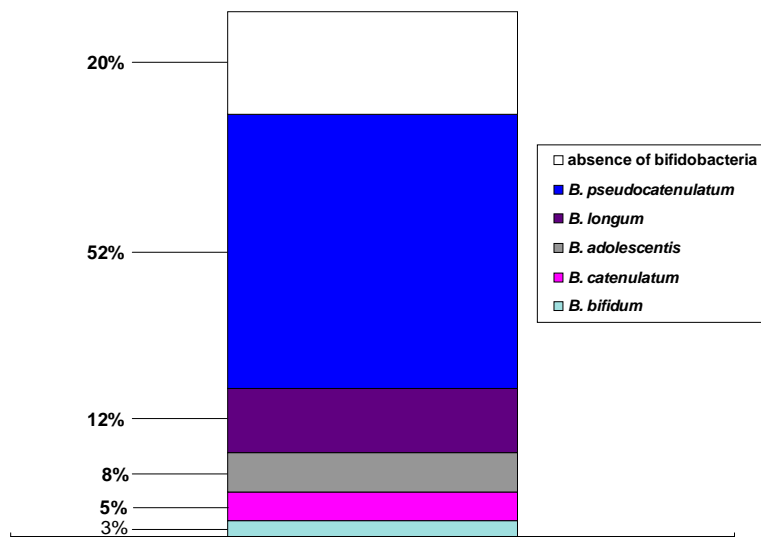


Fig. 3. Distribuzione delle specie di bifidobatteri nelle feci dell'adulto. Dati da Biavati et al. (1984).

Dopo i 65 anni d'età, poi, *Bacteroides*, *Eubacterium* e *Peptostreptococcus* rimangono in numero pressochè costante, i bifidobatteri diminuiscono, mentre *E.coli*, *Streptococcus* spp, *Lactobacillus* spp. e *Clostridium perfringens* aumentano progressivamente (Fig. 1).

1.3 ATTIVITÀ FUNZIONALE DEL MICROBIOTA

1.3.1 Funzioni metaboliche

Il microbiota gastrointestinale svolge numerosissime funzioni che sono il risultato delle interazioni tra batteri, epitelio intestinale ed ospite (Drasar and Hill, 1974; Nicholson et al., 2005) (Fig. 4).

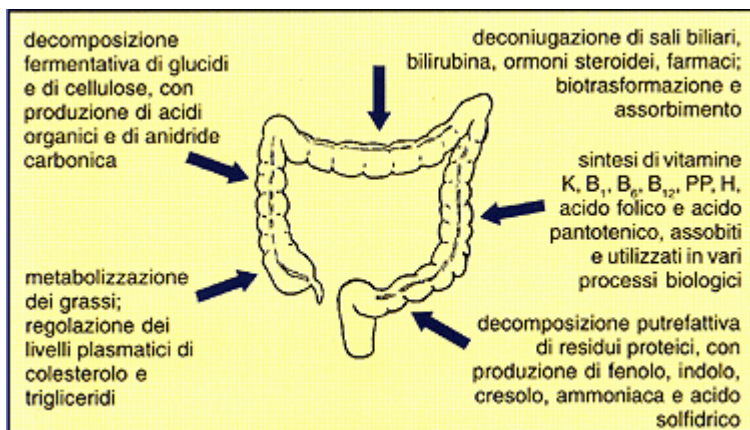


Fig. 4. Schema della trasformazione cui il cibo viene sottoposto.

La principale funzione metabolica svolta dal microbiota intestinale è costituita dalla fermentazione di residui della dieta non digeribili e/o di muco endogeno prodotto dall'epitelio. Il muco dell'ospite, infatti, oltre a fornire protezione contro l'adesione e l'invasione di microrganismi patogeni, costituisce una riserva consistente di glicani, mucina, glicosfingolipidi, acido ialuronico ed eparina (Hooper et al., 2002), e permette, quindi, di mitigare gli effetti relativi a drastici cambiamenti nella disponibilità di polisaccaridi della dieta (Bäckhed et al., 2005).

La biodiversità della comunità microbica garantisce la presenza di numerosi enzimi e pathway biochimici diversi da quelli costitutivi dell'ospite. Nell'uomo e nel topo l'analisi metagenomica del microbioma intestinale ed il confronto tra diversi ecosistemi microbici ha evidenziato, infatti, l'arricchimento in geni appartenenti alle categorie e pathway KEGG [Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kanehisa et al., 2004)] relativi a metabolismo di carboidrati e glicani. *B. longum* e *Bacteroides thetaiotaomicron* dedicano circa l'8% del loro genoma a funzioni di trasporto degradazione di carboidrati (Schell et al., 2002; Xu et al., 2003).

Il genoma umano da 2.85 Gb contiene solamente 98 note o probabili idrolasi glicosidiche, e manca delle attività enzimatiche necessarie per la degradazione di polisaccaridi contenenti xilani, pectine e arabinosio, componenti comuni delle fibre assunte con la dieta.

L'attività metabolica del microbiota determina il recupero di energia e di substrati assorbibili per l'ospite, ed il rifornimento di energia e prodotti nutritivi per la crescita dei batteri intestinali. Nel colon, la maggior fonte di energia microbica è la

fermentazione di carboidrati non digeribili, quali polisaccaridi (amido, cellulosa, emicellulosa, inulina, pectine e gomme), oligosaccaridi, ed alcoli con la conseguente generazione di acidi grassi a corta catena (SCFA), H₂ e CO₂.

Il metabolismo anaerobico di peptidi e proteine (putrefazione) ad opera del microbiota intestinale, determina la produzione di SCFA ma, allo stesso tempo, comporta la produzione di una serie di substrati potenzialmente tossici, quali ammonio, ammine, fenoli, tioli e indoli (Smith and Macfarlane, 1996). Le fonti proteiche disponibili includono elastina e collagene provenienti da fonti alimentari, enzimi pancreatici, cellule epiteliali morte e batteri lisati (Salminen et al., 1998). La disponibilità giornaliera di substrati nel colon umano adulto è di circa 20-60 g di carboidrati e 5-20 g di proteine (Silvester et al., 1995); la produzione giornaliera di SCFA si aggira sui 400 mM. A livello di cieco e colon ascendente, una fermentazione saccarolitica intensa determina una produzione consistente di SCFA e si accompagna a valori acidi di pH (5-6) e ad una rapida crescita batterica (Fallingborg, 1999). Al contrario, la disponibilità di substrato diminuisce nel colon discendente, il pH si avvicina alla neutralità, i processi putrefattivi diventano quantitativamente più importanti e le popolazioni batteriche appaiono statiche. Gli SCFA svolgono un'importante funzione a livello della fisiologia dell'ospite. In particolare, il butirrato rappresenta la principale sorgente energetica delle cellule epiteliali del colon (circa il 70% dell'intake energetico), che lo consumano quasi interamente (Cummings et al., 1987). Acetato e propionato, invece, sono in grado di modulare il metabolismo del glucosio; il loro assorbimento determina una minore risposta glicemica dopo ingestione di glucosio orale o di un pasto standard. Un basso indice glicemico è stato, infatti, riportato per numerosi cibi caratterizzati da alte percentuali di carboidrati non digeribili. I microrganismi del colon esercitano un ruolo fondamentale anche nella sintesi di vitamine, quali B12 e K e nell'assorbimento di ioni calcio, magnesio e ferro.

- Al microbiota intestinale sono state, inoltre, attribuite;
- funzioni bioremediation-like, quale la detossificazione di carcinogeni, il che potrebbe modulare la suscettibilità dell'ospite a differenti tipi di neoplasma, sia all'interno che all'esterno dell'intestino;

- la degradazione dell'ossalato, i cui livelli sono stati correlati alla predisposizione allo sviluppo di calcoli renali;
- la modificazione degli acidi biliari con conseguenti alterazioni del metabolismo lipidico dell'ospite.

Sulla base delle funzioni metaboliche esercitate dalla microflora intestinale, appare evidente come il valore nutritivo e/o energetico del cibo non sia, quindi, un valore assoluto ma largamente influenzato dalle capacità digestive del microbiota del singolo individuo (Martin et al., 2007). Lo studio del profilo microbico di individui sani e con patologie potrebbe fornire importanti indicazioni per formulare diete personalizzate al fine di modulare la composizione del microbiota verso lo stato di salute.

1.3.2 FUNZIONE PROTETTIVA DEL MICROBIOTA INTESTINALE

1.3.2.1 Inibizione dei patogeni

L'epitelio mucoso intestinale, che separa il milieu interno dall'ambiente luminale, svolge una funzione di barriera contro i patogeni.

Tale protezione è modulata in modo importante anche dal microbiota che anch'esso svolge un importante funzione contro la colonizzazione dei microrganismi patogeni. Animali germ-free, infatti, risultano più sensibili alle infezioni. I meccanismi implicati nell'effetto barriera sono numerosi. In vitro, i batteri competono per siti d'attacco a livello dell'orlo a spazzola delle cellule dell'epitelio intestinale, prevenendo l'adesione ed impedendo la successiva penetrazione di microrganismi enteroinvasivi (Bernet et al., 1994). Anche l'affinità per i nutrienti può essere un fattore di competizione per la colonizzazione microbica. Infine, i batteri possono inibire la crescita di eventuali patogeni mediante produzione di sostanze antimicrobiche, le batteriocine (Lievin et al., 2000). L'ospite può controllare la produzione di tali sostanze, poiché la maggior parte di esse sono proteine, degradabili da proteasi digestive.

Il microbiota intestinale è paragonabile, quindi, ad un efficiente e stabile bioreattore naturale, che oppone resistenza alla colonizzazione di subpopolazioni patogene che

potrebbero danneggiare ma soprattutto ridurre significativamente il benessere dell'ospite.

La barriera mucosa separa il milieu interno dall'ambiente luminale. La funzione barriera dipende dall'integrità della mucosa e dalla reattività di fattori dinamici di difesa, quali flusso sanguigno mucosale, secrezioni epiteliali, e cellule immunocompetenti.

1.3.2.2 Effetto protettivo sulle malattie intestinali [intestinal bowel disease (IBD)] e nervose

Sono state osservate differenze nella composizione microbica fra individui sani e individui con colite ulcerativa o malattia di Chron: una significativa diminuzione di lattobacilli è stata rilevata in pazienti con IBD. Ci sono evidenze scientifiche che le IBD siano una conseguenza di una risposta immunitaria cellula-mediata eccessiva: fra i possibili induttori di questo stato patologico sono compresi i batteri commensali. E' noto che le IBD siano legate ad un aumento dell'infiammazione che causa un incremento della risposta immunitaria (Sartor, 2000). In condizioni patologiche, infatti, come infiammazione acuta o cronica e danneggiamento di tessuti, il sistema immunitario è attivato e viene aumentata l'attività dei macrofagi che determinano a loro volta la produzione e il rilascio di citochine, come interleukin (IL-1b e IL-6), tumour necrosis factor (TNFa) e interferon (INF). E' noto da tempo che le citochine prodotte e rilasciate durante malattie sistemiche agiscono come neuromodulatori. Esse rappresentano il fattore chiave nella mediazione centrale delle caratteristiche comportamentali, neuroendocrine e neurochimiche dei disordini depressivi e determinano numerosi sintomi strettamente simili a quelli osservati nella depressione: è stato riportato che malattie sistemiche caratterizzate da infiammazioni croniche, come l'artrite reumatoide e le IBD, siano accompagnate da depressione (Miller and O'Callaghan, 2005; Schiepers et al., 2005).

Ci sono, quindi, evidenze scientifiche della relazione fra malattie intestinali e presenza di stati depressivi ma non ci sono a tutt'oggi studi sull'ecologia microbica dell'intestino in individui con IBD depressivi. Circa il 30% degli individui con depressione hanno una IBD diagnosticata. Pazienti con IBD hanno un microbiota intestinale con un accresciuto numero di aerobi e con una riduzione del rapporto

normale fra anaerobi e aerobi. La modulazione del microbiota intestinale con il ripristino delle condizioni di equilibrio fra i gruppi microbici potrebbe indurre una diminuzione dei fenomeni infiammatori con miglioramento sia delle malattie gastrointestinali sia dei disordini depressivi ad esse collegate.

CAPITOLO 2

IL GENERE *BIFIDOBACTERIUM*

2.1 EVOLUZIONE DEGLI STUDI SUL GENERE *BIFIDOBACTERIUM*

Nel 1900, all'Istituto Pasteur di Parigi, Tissier osservò e isolò per la prima volta, dalle feci di neonati allattati al seno, un batterio con un'insolita e caratteristica forma a "Y" (Fig. 5). Questo batterio, che era anaerobio stretto, Gram-positivo e non produceva gas durante la crescita, per le sue caratteristiche morfologiche venne da lui chiamato *Bacillus bifidus communis* (Tissier, 1900).

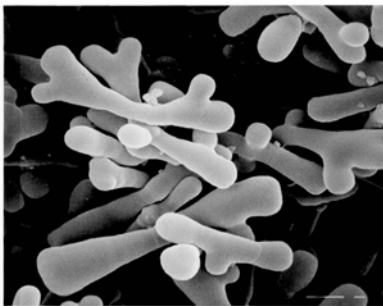


Fig. 5. Microfotografia al microscopio elettronico di *Bifidobacterium* spp.

Più o meno nello stesso periodo furono condotte estese ricerche sui batteri produttori di acido lattico e furono isolati ceppi batterici con morfologia simile, che vennero classificati fra i lattobacilli e denominati *Lactobacillus bifidus* (Holland, 1920). Nel 1924 Orla-Jensen e coll. approfondirono gli studi sui batteri lattici e proposero di classificare *B.bifidus communis* come specie a sè all'interno del genere *Lactobacillus*, indicandolo come possibile anello di collegamento fra i batteri lattici e i batteri propionici e proponendo un nome più appropriato: *Bacterium bifidum* (Orla-Jensen *et al.*, 1924).

Fino alla metà degli anni cinquanta, però, gli studi sui bifidobatteri furono solo sporadici e la maggior parte di questi erano casuali, all'interno di studi molto più ampi sui lattobacilli, la cui classificazione veniva costantemente revisionata. Questi studi preliminari, infatti, pur mostrando che i due generi microbici erano separati, non erano ancora completamente convincenti (Sharpe, 1955).

Il primo tentativo per riclassificare i bifidobatteri coronato da successo fu compiuto solo più tardi da Dehnert, che separò i bifidobatteri isolati dalle feci di lattanti allattati al seno in cinque “gruppi”, sulla base delle loro caratteristiche morfologiche, sierologiche e fermentative (Dehnert, 1957).

Successivamente Lerche e Reuter condussero uno studio sui bifidobatteri isolati dalle feci di adulti e sulle basi della morfologia cellulare e dell’aspetto delle colonie distinsero tre “tipi” (Lerche and Reuter, 1961). Uno studio ancora più approfondito sui bifidobatteri e sulla loro tassonomia fu condotto successivamente sempre da Reuter su ceppi isolati dalle feci sia di lattanti allattati al seno che di adulti (Reuter, 1963). Questo studio permise di modificare la precedente classificazione dei bifidobatteri, introducendo la designazione di “specie” al posto dei termini “tipi” o “gruppi” e, sulla base delle caratteristiche delle colonie, della morfologia e degli studi di fermentazione, vennero aggiunte a *B.bifidum* altre sette specie distinte: *B.adolescentis*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.lactentis*, *B.liberorum*, *B.longum* e *B.parvulorum*.

Il lavoro di Reuter venne, poi, confermato e revisionato in Giappone da Mitsuoka, il cui maggior contributo all’avanzamento delle ricerche, fu la scoperta di nuove specie di bifidobatteri nelle feci di animali. Egli, inoltre, dimostrò che le specie trovate nelle feci umane non si ritrovavano negli animali e descrisse tre nuove specie esclusivamente di origine animale: *B.longum* var. *animalis* (diversa da *B.longum* var. *longum* di origine umana), *B.pseudolongum* e *B.thermophilum* (Mitsuoka, 1969).

Nello stesso periodo, anche in Italia, furono isolate ed identificate molte nuove specie di bifidobatteri da animali, utilizzando metodologie del tutto innovative, perchè non erano più basate solo su criteri morfologici, fisiologici (attività catalasica e capacità di ridurre il nitrato), sierologici e sulla fermentazione degli zuccheri, ma sull’identificazione di un enzima caratteristico dei bifidobatteri. Questo enzima, la fruttosio-6-fosfato-fosfochetolasi, che permetteva una particolare fermentazione del glucosio ad acido acetico e lattico nella proporzione approssimativa di 1,5:1,0 senza produzione di gas (Scardovi and Trovatelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967), permise a Scardovi e coll. di isolare cinque nuove specie di bifidobatteri. Due di queste vennero isolate dal rumine bovino e vennero denominate *B.globosum* e *B.ruminale* (Scardovi *et al.*, 1969), le altre tre, che presentavano una morfologia abbastanza diversa dai

bifidobatteri fino ad allora conosciuti, vennero isolate dall'intestino di ape (*Apis mellifica* e *Apis indica*), e vennero denominate *B.asteroides*, *B.coryneforme* (per la morfologia simile a quella dei corinebatteri) e *B.indicum* (Scardovi and Trovatelli, 1969).

Poichè vari ricercatori isolavano un sempre crescente numero di ceppi di bifidobatteri da diverse fonti, divenne necessario individuare altri metodi per una corretta collocazione tassonomica dei nuovi isolati.

Uno dei nuovi criteri utilizzato a tale scopo, fu la valutazione della composizione del DNA (GC%), che permise di confermare la separazione netta dei bifidobatteri dai lattobacilli, dai corinebatteri e dai propionibatteri (Sebald *et al.*, 1965; Werner *et al.*, 1966).

Negli anni settanta, è stata applicata estesamente la tecnica di ibridazione del DNA-DNA, sia per verificare la validità delle specie precedentemente proposte, che per riconoscere nuovi gruppi di omologia tra i ceppi che si stavano via via isolando (Scardovi *et al.*, 1970). Così, ad esempio, *B. lactentis*, *B. liberorum* e *B.infantis*, vennero raggruppate nell'unica specie *B. infantis* (oggi riclassificata come *B. longum* subsp. *infantis* (Mattarelli *et al.*, 2008); le due "biovars" di *B. longum*, proposte da Mitsuoka, furono considerate specie distinte e denominate rispettivamente *B. animalis* e *B. longum* e le due specie *B.ruminale* e *B.thermophilum* vennero unite come *B. thermophilum*.

Grazie a queste nuove tecniche di identificazione, vennero isolate numerose altre specie di bifidobatteri da *habitat* diversi: *B.suis* (Matteuzzi *et al.*, 1971), *B.angulatum*, *B.catenulatum*, *B.dentium* (Scardovi and Crociani, 1974), *B.magnum* (Scardovi and Zani, 1974), *B.minimum* (Scardovi and Trovatelli, 1974), *B.pullorum* (Trovatelli *et al.*, 1974), *B.boum*, *B.choerinum*, *B.cuniculi* e *B.pseudocatenulatum* (Scardovi *et al.*, 1979).

Sempre negli anni settanta venne, poi, introdotta negli studi tassonomici dei batteri l'analisi della sequenza delle basi dell'rRNA (Fox *et al.*, 1980), che portò all'assegnazione dei bifidobatteri alla famiglia delle *Actinomycetaceae* anche se la struttura della mureina della parete cellulare, dimostrava che essi fossero più vicini alle *Lactobacillaceae* che alle *Actinomycetaceae* (Kandler and Lauer, 1974).

Altri ritocchi alla classificazione vennero apportati dopo l'introduzione dell'elettroforesi delle proteine cellulari solubili su gel di poliacrilamide, come criterio di identificazione delle specie (Biavati *et al.*, 1982). Mediante questo tipo di elettroforesi venne, infatti, evidenziata una banda che compariva in tutti i profili elettroforetici dei bifidobatteri e che migrava nella stessa posizione per tutte le specie esaminate, ad eccezione di *B.boum* per cui poteva essere un'utile indicazione di appartenenza al genere per quei microrganismi ancora sconosciuti. Inoltre, venne riconosciuta un'eccellente rispondenza con i dati ottenuti mediante la tecnica di ibridazione del DNA-DNA. . Nell'8th edizione del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology i bifidobatteri sono stati classificati per la prima volta come genere *Bifidobacterium* comprendente 8 specie; esso era incluso nella famiglia *Actinomycetaceae* dell'ordine *Actinomycetales*. La descrizione di nuove specie e il riarrangiamento della precedente classificazione ha portato alla descrizione delle 24 specie riportate nella prima edizione del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Successivamente la descrizione di altre 8 specie ha aumentato il numero delle specie a 32. Nel 1997, Stackebrand et al. attraverso l'analisi 16S rRNA hanno proposto una nuova struttura gerarchica che ha riunito il genere *Gardnerella* col genere *Bifidobacterium* nella singola famiglia delle *Bifidobacteriaceae* (Biavati and Mattarelli, 2007). Attualmente la famiglia *Bifidobacteriaceae* comprende i generi *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Metiscardovia*, *Parascardovia* e *Scardovia* (Fig. 6).

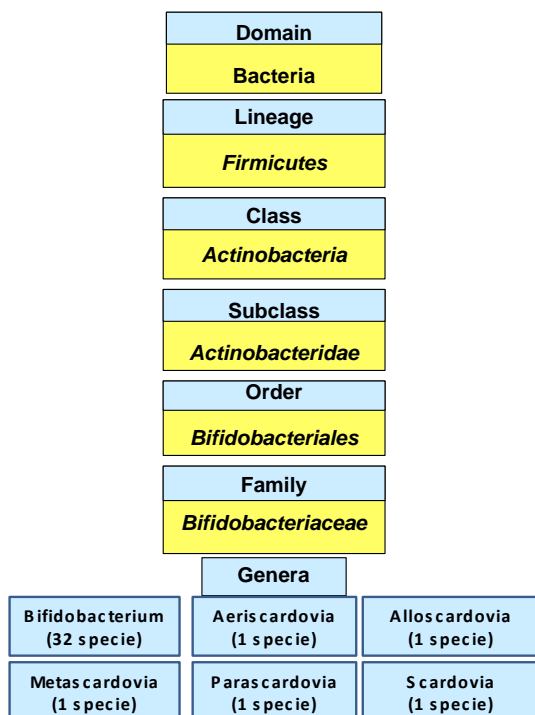


Fig. 6. Filogenesi della famiglia *Bifidobacteriaceae*

Tutti i generi suddetti comprendono un'unica specie, mentre il genere *Bifidobacterium* include 32 specie.

2.2. BIOLOGIA DEL GENERE *BIFIDOBACTERIUM*

I bifidobatteri sono batteri anaerobi, anche se la loro sensibilità all'ossigeno è diversa fra le varie specie e fra i ceppi delle singole specie (Prévot *et al.*, 1967). Sono batteri Gram-positivi, asporigeni, immobili, con cellule bastoncellari incurvate, a contorni irregolari. Generalmente sono catalasi negativi e solo le specie aerotolleranti (*B.indicum* e *B.asteroides*) possono diventare catalasi-positive quando crescono in presenza di aria, con o senza l'aggiunta di emina (Scardovi and Trovatelli, 1969); sono indolo negativi, non riducono i nitrati a nitriti, nè i solfati a solfuri.

La sopravvivenza delle colture va da tre settimane a un mese, se conservate a 4°C e può raggiungere diversi anni dopo liofilizzazione.

2.2.1. Caratteri morfologici

La morfologia particolare dei bifidobatteri permise a Tissier di isolare dalle feci di neonati allattati al seno batteri a forma di “Y” o “V”, definiti “bifidobatteri” proprio per la loro forma (Tissier, 1900).

Generalmente, questi batteri hanno cellule lunghe circa 2-5 μm , di forma bastoncellare, quasi sempre con estremità bifide, ramificazioni, rigonfiamenti e protuberanze (**figura 1**). Anche se le forme a “Y” e a “V” sono le più frequenti, non sono insolite forme più regolari e coccoidi, specialmente in relazione alla vicinanza con altre specie o in particolari condizioni di coltura (Reuter, 1963; Scardovi and Trovatelli, 1969). Già lo stesso Tissier aveva notato che i batteri da lui isolati assumevano forme rigonfie in risposta all’acidità, alle temperature estreme o alle inadeguate fonti di azoto nel substrato (Tissier, 1900). Successivamente questo aspetto fu riscontrato anche da Gylleberg che notò che dopo ripetuti trapianti *B.bifidum* modificava la sua morfologia, passando da cellule regolari a irregolari e rigonfie (Gylleberg, 1955). Glick et al. (1960), invece, avevano dimostrato che quando *B.bifidum* var. *pennsylvanicus* veniva fatto crescere in terreni di coltura privi di N-acetil-glucosamina, il costituente principale del peptidoglicano, modificava la sua morfologia da bifida a ramificata, ma se si aggiungevano al terreno alcuni aminoacidi (serina, alanina, acido aspartico, acido glutamico), le cellule passavano dalla forma ramificata a quella curva (Husain *et al.*, 1972). Contemporaneamente Kojima e coll. notarono che anche le concentrazioni di sali sodici e di ioni calcio influivano sulla formazione delle ramificazioni (Kojima *et al.*, 1970).

A questo proposito, sorprendente risultò la scoperta di Biavati e coll. sulle frequenti variazioni di fasi nell’aspetto delle colonie e nella morfologia cellulare che *B.animalis* assumeva quando veniva coltivato in diverse condizioni di anaerobiosi (Biavati *et al.*, 1992).

2.2.2. Composizione della parete

La struttura del peptidoglicano dei bifidobatteri è stata studiata da Kandler e Lauer (Kandler and Lauer, 1974; Veerkamp *et al.*, 1971).

Questi autori hanno dimostrato che come in tutte le specie Gram-positive, anche nei bifidobatteri la parete cellulare è formata principalmente da un unico strato omogeneo di peptidoglicano: un polimero costituito da acido N-acetil-muramico

(NAM) e N-acetil-glucosamina (NAG), legati tramite un legame glicosidico β -(1,4). Al gruppo carbossilico del NAM, poi, è attaccata una catena peptidica di tre aminoacidi (L-alanina, D-acido glutamico, L-lisina o L-ornitina), che nell'insieme rappresenta la parte comune a tutti i bifidobatteri. Le catene delle subunità peptidoglicaniche adiacenti sono, poi, unite le une alle altre da una sequenza di aminoacidi diversa nelle diverse specie (parte variabile) che può essere utilizzabile nella classificazione (Kandler and Lauer, 1974; Weiss and Biavati, 1994)

Anche se il peptidoglicano è sicuramente il componente principale della parete, Kandler e Lauer hanno dimostrato che essa contiene pure grandi quantità di polisaccaridi: normalmente glucosio e galattosio, spesso associati al ramnosio. La presenza di acidi lipoteicoici (polimeri di alcoli polivalenti legati ai lipidi della membrana plasmatica) sulla parete di *B.bifidum* è stata mostrata per la prima volta da Veerkamp e coll. (Veerkamp *et al.*, 1983) e studi immunoistochimici successivi hanno mostrato che questi acidi lipoteicoici, da soli o associati a proteine, sono responsabili dell'idrofobicità della superficie batterica (Op Den Camp *et al.*, 1985).

2.2.3 La membrana citoplasmatica

La membrana citoplasmatica dei bifidobatteri è stata studiata dettagliatamente su *B.bifidum*. Essa appare come una struttura di 9 nm di spessore, costituita da un doppio strato di lipidi a cui è frapposto un singolo strato di proteine. Come in tutte le cellule procariotiche, anche nei bifidobatteri i lipidi di membrana sono rappresentati nella quasi totalità da fosfolipidi: fosfatidilglicerolo, difosfatidilglicerolo, poliglicerolfosfolipidi (Exterkate *et al.*, 1971). Gli acidi grassi che più frequentemente costituiscono i fosfolipidi delle membrane sono: l'acido miristico, l'acido palmitico, l'acido stearico e l'acido oleico (Ballongue, 1993). Le proteine che costituiscono la membrana non sono glicosilate e possono essere integrali o periferiche.

All'interno del citoplasma, la membrana plasmatica dà origine a numerose invaginazioni, dette mesosomi, a cui sono stati attribuiti ruoli diversi e la cui presenza sembra dipendere dalla specie e dalle condizioni di cultura.

2.2.4 Struttura del citoplasma

Come in tutte le cellule procariotiche, anche nel citoplasma nei bifidobatteri non sono mai stati rinvenuti complicati sistemi di membrane paragonabili a quelli delle cellule eucariotiche. Attualmente sono state rinvenute solo inclusioni che contengono materiale nutritivo di riserva (polisaccaridi o polifosfati), proteine solubili, ribosomi ed altre molecole di piccole dimensioni.

2.3 CARATTERISTICHE FISILOGICHE

2.3.1 Temperatura e pH

La temperatura ottimale di sviluppo dei bifidobatteri è compresa fra 37°C e 41°C, con limiti a temperature inferiori a 20°C e superiori a 46°C (Gavini *et al.*, 1991).

Il pH ottimale di sviluppo è compreso tra 5,0 e 7,0, con limiti a pH inferiori a 4,5 e superiori a 8,0. I bifidobatteri sono microrganismi acido-tolleranti, ma non acidofili (Scardovi, 1986).

2.3.2 Sensibilità all'ossigeno

I bifidobatteri sono microrganismi anaerobi anche se la loro sensibilità all'ossigeno varia da specie a specie e da ceppo a ceppo. Anche se i meccanismi che sono alla base dell'aerotolleranza non sono ancora del tutto noti, è stato ipotizzato che l'ossigeno atmosferico possa interferire sullo sviluppo di alcuni ceppi o aumentando il potenziale di ossido-riduzione (Rasic and Kurmann, 1983), o producendo H₂O₂, inibitore della fruttosio-6-fosfato-fosfochetolasi, l'enzima indispensabile ai bifidobatteri per il metabolismo dei polisaccaridi. La tolleranza all'ossigeno può, quindi, essere spiegata come la capacità che alcuni ceppi hanno di degradare H₂O₂ o di impedirne la formazione.

2.3.3 Agenti antimicrobici (antibiotici e oli essenziali)

E' stata saggiata la sensibilità agli antibiotici in 15 specie di bifidobatteri con il metodo delle diluizioni (Matteuzzi *et al.*, 1983). I composti più attivi sono risultati la bacitracina, la clindamicina, il cloramfenicolo, l'eritromicina, la lincomicina, la vancomicina e la penicillina G. Al contrario, i ceppi saggiati sono risultati resistenti verso l'acido nalidixico, la kanamicina, la gentamicina, il metronidazolo e la

polimixina B. Neomicina, streptomina e tetraciclina hanno dimostrato attività variabile. Per l'isolamento e l'identificazione dei bifidobatteri in prodotti caseari è risultato particolarmente efficace l'utilizzo della dicloxacillina (Sozzi et al., 1990).

Risultati incoraggianti sono stati, inoltre, ottenuti con l'uso di oli essenziali come agenti antimicrobici verso dieci specie di bifidobatteri di origine umana. Da questo studio è emerso che gli oli più efficaci sono risultati la cannella, il garofano, il geranio, l'origano, l'origano di Spagna, la santoreggia e il timo (Biavati *et al.*, 1997).

2.4. METABOLISMO

2.4.1 Fermentazione del glucosio

Nel genere *Bifidobacterium* il D-glucosio ed il D-galattosio non vengono fermentati mediante la caratteristica via dei pentosi, ma mediante una via metabolica caratteristica, detta via della fruttosio-6-fosfato-fosfochetolasi (F6PPK). Questo enzima, considerato l'enzima chiave dei bifidobatteri, è in grado di scindere il fruttosio-6-fosfato, derivato dalla demolizione del glucosio, in eritrosio-4-fosfato e acetil-fosfato. Mediante trasformazioni enzimatiche successive, l'eritrosio-4-fosfato così ottenuto può essere ulteriormente trasformato dalla transaldolasi e transchetolasi in xilulosio-5-fosfato, che a sua volta darà origine ad acido lattico, mentre l'acetil-fosfato darà origine ad acido acetico (Fig. 7).

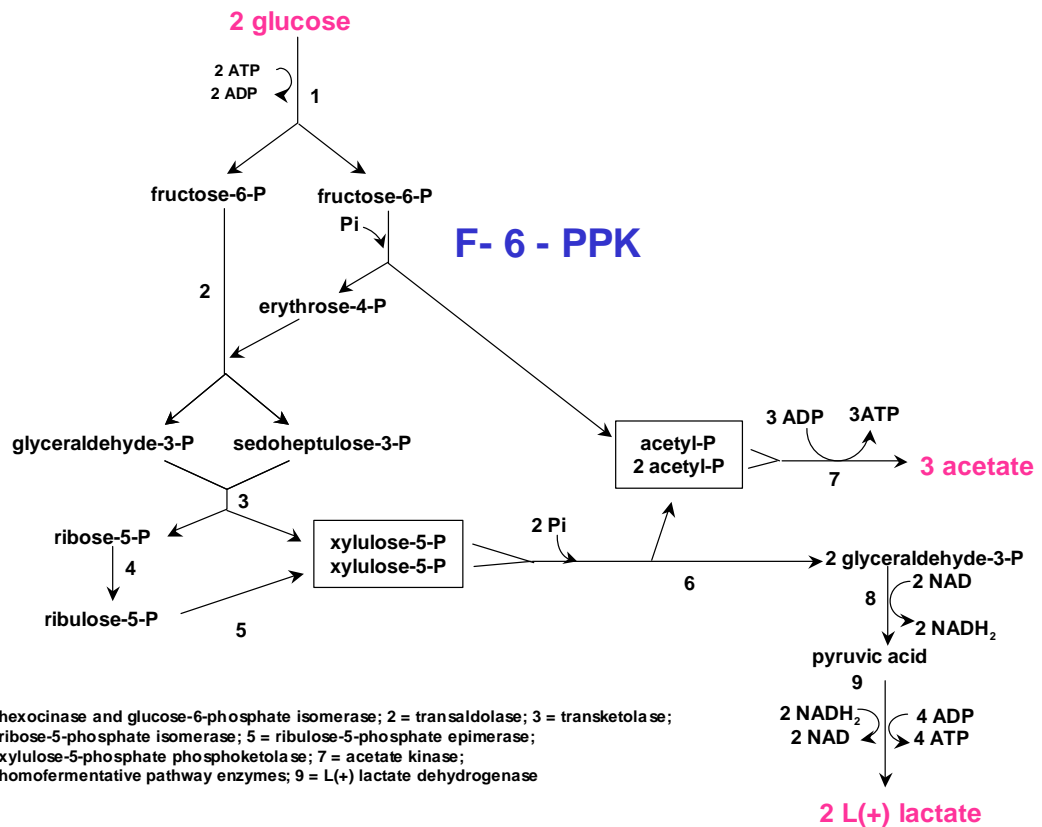
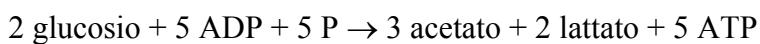


Fig. 7. Metabolismo del glucosio nei bifidobatteri

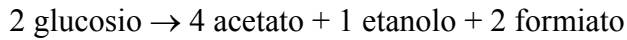
L'equazione globale della reazione può essere così schematizzata:



Nelle condizioni ottimali il rapporto teorico di acido lattico:acido acetico è 1,0:1,5 e la resa energetica è di 2,5 molecole di ATP, per ogni molecola di glucosio degradata (Scardovi and Trovatelli, 1965).

In certe condizioni, però, il bilancio della reazione può essere alterato per la produzione di altri metaboliti. L'acido piruvico, per esempio, può non essere totalmente convertito in acido lattico, ma dare origine ad acido formico e ad acetilCoA, che verrà ulteriormente convertito in etanolo ed acido acetico (Lauer and Kandler, 1976).

L'equazione globale di questa reazione alternativa può essere così schematizzata:



Alcuni ceppi di bifidobatteri, inoltre, possono produrre scarse quantità di acido succinico, mentre l'acido butirrico e l'acido propionico non vengono mai prodotti.

2.4.2 Fermentazione di carboidrati semplici, complessi e mucine

Oltre al glucosio, le diverse specie di bifidobatteri sono in grado di fermentare numerosi altri zuccheri semplici e questa loro capacità è un test che potrebbe essere utilizzato per la loro identificazione a livello di specie (Tabella 1).

Species	Substrates														
	A				B					C					
	alpha-L-fucose	D-galactosamine	D-glucosamine	D-glucuronate	amylopectin	amylose	arabinogalactan	pectin	xylan	dextran	porcine gastric mucin	arabic	ghatti	guar	locust bean
<i>B. adolescentis</i>	^{a,b}	-	-	-	+ ^c	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-
<i>B. angulatum</i>	-	v	v	-	+ ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i>	-	-	v	-	v	v	-	^{a,b}	^{a,b}	-	+	-	-	-	-
<i>B. breve</i>	+	v	v	-	v	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i>	-	v	v	-	^{a,b}	v	-	v	v	-	-	-	-	-	-
<i>B. denticolens</i>	-	-	+ ^c	-	-	-	-	-	-	+ ^c	-	-	-	-	-
<i>B. dentium</i>	-	^{a,b}	v	-	+	+	-	v	v	-	-	-	^{a,b}	+	+
<i>B. gallicum</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. infantis</i>	+ ^c	-	v	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. inopinatum</i>	-	-	-	^{a,b}	-	-	-	-	-	+ ^c	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	-	v	v	-	-	-	+ ^c	^{a,b}	-	-	-	v	v	-	^{a,b}
<i>B. pseudocatenulatum</i>	v	-	^{a,b}	-	+ ^c	+ ^c	-	-	v	-	-	-	v	-	-

^a, Symbols: +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; v, 11-89% of strains are positive. ^b, a few strains ferment this sugar; ^c, a few strains do not ferment this sugar. Substrates not fermented by any of the strains tested: a bovine submaxillary mucin, chondroitin sulfate, alpha-D-fucose, D-galacturonate, galactaric acid, karaya, heparin, hyaluronate, laminarin, ovomucoid, polygalacturonate. A, monosaccharides; B, polysaccharides; C, gums

Tabella 1. Degradazione di carboidrati complessi da parte di bifidobatteri.

Come si può osservare dalla Tabella 1, a parte il saccarosio, che viene fermentato da tutte le specie fino ad ora identificate, alcuni altri zuccheri (raffiniosio, fruttosio, galattosio, maltosio), vengono metabolizzati da molte specie, mentre altri (sorbitolo, melicitosio, gluconato, trealosio, mannitolo) solo da poche. Anche se non è ancora stato dimostrato con certezza, sembra che queste differenze siano dovute al fatto che alcune specie non possiedono i sistemi di trasporto specifici per tali zuccheri.

Oltre agli zuccheri semplici, molte specie di bifidobatteri sono in grado di fermentare alcuni zuccheri complessi (Crociani *et al.*, 1994). Questa capacità riveste una notevole importanza se si pensa che le principali fonti di carboidrati degradabili presenti nel colon sono generalmente polisaccaridi complessi, che vengono ingeriti dall'uomo e dagli animali con la dieta. Da uno studio condotto sulla fermentazione una serie di carboidrati semplici, complessi e gomme è stato possibile costruire una chiave per l'identificazione di alcune specie del genere *Bifidobacterium*.

2.4.3 Enzimi

Oltre all'enzima F6PPK, che fino a qualche tempo fa si riteneva fosse esclusivo dei bifidobatteri, mentre recentemente è stato riscontrato anche in altri generi, fra cui *Gardnerella vaginalis* (Gavini *et al.*, 1996), nei bifidobatteri sono state identificate numerose glicosidasi, enzimi in grado di idrolizzare gli oligosaccaridi a monosaccaridi: α e β -D-galattosidasi, α e β -D-glucosidasi, β -D-fruttofuranosidasi, β -glucuronidasi, N-acetil-D-glucosaminidasi, α -L-arabinopiranosidasi, arabinogalattanasi, α -D-neuraminidasi. Il complesso di questi enzimi non si esprime in tutte le specie ed alcuni enzimi possono essere indotti ad esprimersi solo in presenza dello specifico carboidrato. Studi sperimentali condotti da Crociani e coll. hanno dimostrato che solo la specie *Bifidobacterium bifidum* è in grado di degradare la mucina gastrica intestinale (Crociani *et al.*, 1994). I bifidobatteri possiedono, inoltre, numerose proteasi, che permettono loro di trasformare i polipeptidi in singoli aminoacidi più facilmente utilizzabili. Scardovi *et al.* (1979) misero in evidenza che la transaldolasi (che interviene nella via metabolica del fruttosio-6-fosfato) e la 6-fosfogluconato-deidrogenasi (che interviene nella via metabolica degli esosi monofosfati), presentando isoenzimi, sono molto importanti per lo studio

tassonomico del genere *Bifidobacterium*. La maggior parte delle specie di bifidobatteri esaminate mediante elettroforesi su amido, infatti, possiedono una sola banda per ciascun enzima e quando le bande sono molteplici, tale molteplicità è risultata caratteristica della specie (Fig. 7).

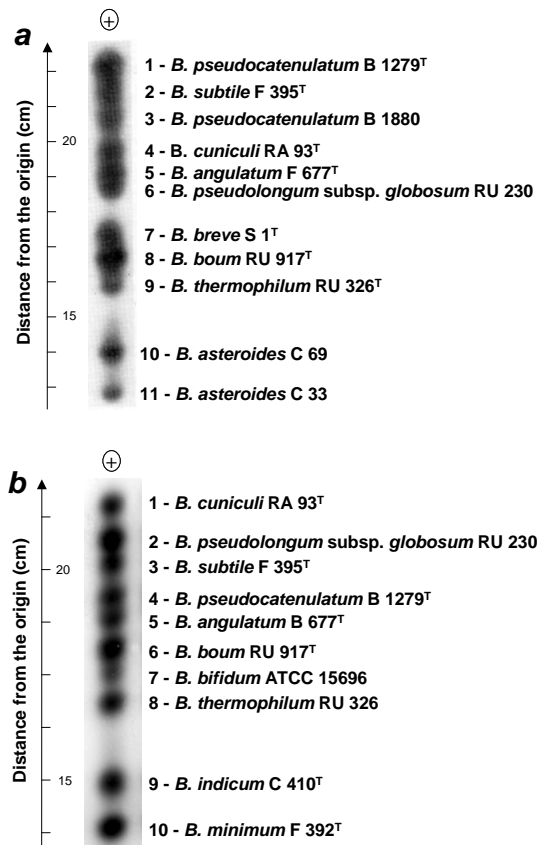


Fig. 7. Migrazione coelettroforetica su gel di amido di reference strains di *Bifidobacterium*. (a), 11 ceppi dopo colorazione con 6-phosphogluconato deidrogenasi e (b), 10 ceppi dopo colorazione con transaldolasi.

Studi compiuti sull'attività ureasica di 21 specie di bifidobatteri hanno dimostrato che solo la specie *B.suis* manifesta una marcata attività ureolitica , mentre le specie *B.breve*, *B.magnum*, *B.pseudocatenulatum* e *B.subtile* presentano questa attività solo in un numero limitato di ceppi. Gli alti livelli di ureasi trovati anche in assenza di urea hanno, poi, suggerito che questo enzima non possa essere indotto (Crociani and Matteuzzi, 1982).

Hatanaka et al. (1987) hanno dimostrato che gli enzimi glutamato-deidrogenasi e glutamina-sintetasi, riscontrati solo nelle specie *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. thermophilum*, possono essere coinvolti nell'assimilazione dell'ammoniaca.

2.4.4 Fisiologia e metabolismo

I bifidobatteri sono microrganismi anaerobi, la cui sensibilità all'ossigeno cambia a seconda delle specie ed anche all'interno delle diverse specie a seconda dei ceppi. I bifidobatteri sono catalasi-negativi.

La temperatura ottimale per la crescita è 30-41°C, ma per le specie umane è 36-38°C. Non si ha crescita sotto i 20°C, ad eccezione della specie *B. psychroaerophilum*, e sopra i 46°C. La crescita a 45°C sembra discriminare fra le specie di origine umana ed animale in quanto solo queste ultime sono in grado di crescere a questa temperatura.

Il pH ottimale è fra 6.5 e 7.0 e non si ha crescita sotto pH 4.5. I bifidobatteri sono infatti acido tolleranti ma non sono acidofili.

Il G+C% varia da 47 a 67%, con differenze fra le varie specie..

Una particolarità del genere *Bifidobacterium* è il suo metabolismo degli esosi cosiddetto "fructose-6-phosphate shunt" o "bifidus shunt". L'enzima chiave di questo metabolismo è la fruttosio-6-fosfato fosfochetolasi, che scinde l'esoso fosfato in eritrosio-4-fosfato e acetil-fosfato. Dal tetrosio e dall'esoso fosfato attraverso la successiva azione di transaldolasi e transchetolasi, sono formati i fosfati pentosi che attraverso la scissione 2-3, producono acido lattico e addizionali quantità di acido acetico nel rapporto teorico finale di 1.0:1.5. La formazione di acido formico ed etanolo può alterare il bilancio della fermentazione. Le specie differiscono tra loro per la produzione di quantità variabili di acetato, lattato, etanolo e formiato pur crescendo nelle stesse condizioni.

I bifidobatteri utilizzano una grande varietà di mono e disaccaridi come sorgenti di carbonio e sono in grado di metabolizzare anche i carboidrati complessi che normalmente non sono digeriti nel piccolo intestino. Questa caratteristica conferisce un vantaggio ecologico a chi colonizza l'intestino dove i carboidrati complessi sono presenti o a causa della produzione da parte dell'epitelio dell'ospite, come al mucina,

o perché introdotti con la dieta. I bifidobatteri, infatti, possiedono un'ampia varietà di enzimi che si adattano ai cambiamenti intestinali essendo inducibili in presenza delle sostanze specifiche.

I bifidobatteri, inoltre, sono importanti per la produzione di vitamine nell'uomo (Tabella 2).

	<i>B. breve</i>	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. adolescentis</i>
Tiamina (B1)	+	+++	+	+++	+
Riboflavina (B2)	+	+	+++	++	+
Piridossina (B6)	++	++	+++	+	++
Acido folico (B9)	+	+++	+	++	+
Cobalamina (B12)	+	++	+++	+	+
Acidi ascorbico (C)	++	++	+++	++	+
Acido niocotinico (PP)	+++	+++	+	+++	+
Biotina (H)	++	+++	++	++	++

Tabella 2. Produzione di vitamine in *Bifidobacterium* spp. (Ballongue, 1993).

2.4.5 Caratteristiche nutrizionali

Dal punto di vista nutrizionale, i bifidobatteri sono batteri molto esigenti. La maggior parte delle specie sono in grado di utilizzare sali di ammonio come unica fonte di azoto, ad eccezione delle specie *B.choerinum*, *B.cuniculi*, *B.magnum* e *B.suis*, che richiedono azoto organico (Hassinen *et al.*, 1951). In un terreno di coltura privo di azoto organico è stato, però, riscontrato che alcune specie di bifidobatteri (*B.adolescentis*, *B.animalis*, *B.dentium*, *B.infantis*, e *B.thermophilum*) sono in grado di sintetizzare considerevoli quantità di aminoacidi, fra cui i principali sono: alanina, valina e acido aspartico (Matteuzzi *et al.*, 1978).

Fra i sali minerali richiesti dai bifidobatteri per lo sviluppo, i più importanti sono magnesio, calcio, zinco, manganese e soprattutto ferro.

Per quanto riguarda le vitamine, la loro presenza nel mezzo di coltura non è indispensabile alla crescita dei bifidobatteri, anche se esiste molta eterogeneità fra le specie, poichè alcune di esse sono capaci di sintetizzare tiamina, acido nicotinico, acido folico, piridossina, vitamina B12 (Deguchi *et al.*, 1985) e biotina (Noda *et al.*, 1994).

Alcune specie richiedono, poi, la presenza di fattori di crescita noti come fattori bifidogenici. Attualmente i fattori bifidogenici studiati su *B.bifidum* sono il lattulosio (che però permette lo sviluppo anche di *E.coli* ed è attivo solo *in vivo*), il fattore BF1 (rappresentato da un insieme di oligosaccaridi presenti nel latte di molti mammiferi), il fattore BF2 (che è un proteolizzato specifico della caseina bovina), le glicoproteine del colostro del latte e gli oligosaccaridi (raffiniosio, inulina, frutto-oligosaccaridi, oligosaccaridi di sintesi, gluco-oligosaccaridi) (Ballongue, 1993).

2.4.6 Terreni di coltura

Per isolare i bifidobatteri dai loro *habitat* naturali sono stati utilizzati, nel tempo, numerosi terreni di coltura, contenenti componenti atte ad assicurarne lo sviluppo ed il mantenimento.

Molte specie di bifidobatteri sono in grado di crescere in terreni di coltura complessi, contenenti estratto di fegato (o carne), peptone, estratto di lievito, succo di pomodoro, sangue di pecora (o cavallo), latte umano e sostanze che ne abbassano il potenziale di ossidoriduzione. Una buona parte di questi ingredienti sono presenti nel terreno BL, descritto da Ochi e coll. (Ochi *et al.*, 1964) e nel terreno TPY (Trypticase, Phytone, Yeast extract), descritto da Scardovi (Scardovi, 1986). Nessuno di questi terreni è, però, selettivo e permette la crescita anche di altre forme batteriche, fra cui streptococchi e lattobacilli, le cui colonie non sono distinguibili da quelle dei bifidobatteri.

Per ovviare a queste problematiche, sono stati messi a punto diversi altri terreni, fra cui possiamo ricordare quello denominato YN-6, impiegato da Resnik e Levin, per isolare specie appartenenti al genere *Bifidobacterium* da ambienti acquatici naturali. In questo terreno la selettività è data dalla neomicina, dall'acido nalidixico e dal verde bromocresolo, aggiunti per inibire la crescita rispettivamente dei microrganismi Gram-positivi e Gram-negativi (Resnik and Levin, 1981a). Qualche tempo dopo, Mara e Oragui, modificarono il terreno YN-6, cercando di renderlo più selettivo e lo denominarono YN-17 (Mara and Oragui, 1983). Presto, però ci si accorse che entrambi questi terreni non risultavano particolarmente efficaci, perchè inibivano una parte della popolazione vitale dei bifidobatteri e non consentivano una

facile identificazione delle loro colonie, per cui queste dovevano essere esaminate una per una (Carrillo *et al.*, 1985).

Sonoike *et al.* (1986), basandosi sul fatto che i bifidobatteri sono in grado di metabolizzare frutto-oligosaccaridi e galatto-oligosaccaridi, svilupparono un terreno contenente oligosaccaridi *trans*-galattosilati, come fonti di carbonio. Successivamente Munoa e Peres, svilupparono un nuovo terreno selettivo, definito *Bifidobacterium* Iodoacetate Medium 25 (BIM-25), utilizzando come agenti selettivi antibiotici (acido nalidixico, polimixina B e kanamicina), acido iodoacetico (che inibisce l'enzima gliceraldeide-3-fosfato-deidrogenasi) e 2,3,5-trifenil-tetrazolio-cloride (TTC) (che permette di differenziare le colonie dei bifidobatteri da quelle delle altre specie) (Munoa and Peres, 1988). Più di recente, Bereens ha proposto un terreno la cui selettività non era più data dalla presenza di antibiotici, bensì dalla contemporanea azione dell'acido propionico (0,5%) e dal basso pH (5,0). Sperimentalmente, egli notò che queste condizioni incrementavano lo sviluppo dei bifidobatteri, inibendo quello di microrganismi appartenenti ad altri generi (Bereens, 1990). La selettività del mezzo ottenuta da Bereens venne, poi, confermata da Kaneko e coll. che, a loro volta, osservarono una buona crescita dei bifidobatteri ad alte concentrazioni di acido propionico (Kaneko *et al.*, 1994).

Più recentemente, Hartemink e coll., hanno descritto un nuovo terreno selettivo denominato Raffinose-Bifidobacterium (RB), i cui componenti vennero scelti sulla base delle proprietà fisiologiche dei bifidobatteri (Hartemink *et al.*, 1996).

2.5. CARATTERISTICHE DEL GENOMA

2.5.1 Composizione delle basi del DNA

Il DNA dei bifidobatteri ha un contenuto in Guanina-Citosina (GC%) variabile da 55 a 67 T_m (valore ottenuto col metodo spettrofotometrico), tranne che per *B.inopinatum*, che ha un GC% di 45 T_m (Crociani *et al.*, 1996).

2.5.2 Ibridazione DNA-DNA

La classificazione del genere *Bifidobacterium* basata sulla percentuale di omologia DNA-DNA di diverse specie è stata realizzata, per la prima volta, da Scardovi e coll.

(Scardovi *et al.*, 1970). Questa tecnica, che ha permesso di suddividere una specie in più specie o di raggruppare più specie in una sola ed è attualmente la più affidabile dal punto di vista tassonomico, richiede che per appartenere alla stessa specie due ceppi debbano presentare una percentuale di omologia DNA-DNA maggiore o uguale al 70% (Wayne *et al.*, 1987).

2.5.3 Plasmidi

Sono stati trovati plasmidi soltanto nelle specie *B.asteroides*, *B.breve*, *B.indicum*, *B.longum* e *B.globosum*, anche se sembra che nessun carattere fenotipico sia correlato alla loro presenza (Sgorbati *et al.*, 1982). In nessuna delle altre specie di bifidobatteri descritte successivamente sono mai stati riscontrati plasmidi.

2.6 ECOLOGIA

Le specie descritte fino ad oggi sono raggruppate in tre nicchie ecologiche:

- l'intestino umano, la vagina e la cavità orale;
- l'intestino animale;
- l'intestino degli insetti (intestino delle api e dei bombi);

Fra le 11 specie di *Bifidobacterium* trovate nelle acque reflue, sei sono isolate da uomo e cinque da animali.

In generale, le specie di *Bifidobacterium* sono tipiche o dell'uomo o degli animali, con l'eccezione di alcune specie isolate sia nel microbiota intestinale dei vitelli sia nei neonati allattati al seno.

Le diverse specie che si trovano nel corpo umano mostrano un diverso adattamento ai cinque habitat del corpo umano: intestino dei neonati, intestino degli adulti, vagina, carie dentarie e stomaco ipocloridrico.

Numerosi studi hanno dimostrato una successione di specie di bifidobatteri dal neonato, all'adulto e all'anziano (Fig. 3). La presenza di bifidobatteri nel tratto gastrointestinale di adulti e bambini ha stimolato l'interesse di molti batteriologi e nutrizionisti. Nel tratto intestinale di animali e uomo, i bifidobatteri coesistono con una grande varietà di batteri, la maggioranza dei quali sono anaerobi obbligati, e esiste una rete di interrelazioni gli uni con gli altri.

2.6.1. Habitat umano

I bifidobatteri colonizzano il tratto intestinale fin dalla nascita. Essi compaiono fra il secondo e il quinto giorno e divengono dominanti una settimana dopo la nascita. I bifidobatteri di origine umana sono stati ritrovati, principalmente, nelle feci di infanti, di adulti (Biavati et al., 1984-1986), nella vagina umana (Crociani *et al.*, 1973) e nella cavità orale (Scardovi and Crociani, 1974). In questi *habitat* le specie *B. bifidum* e *B. longum* sono ubiquitarie, mentre le altre sono presenti solo in alcuni degli *habitat* studiati.

Essi sono anche normalmente presenti nella cavità orale dei bambini e possono diventare successivamente organismi autoctoni della placca dentaria degli adulti. Le specie isolate dalla cavità dentale in associazione con la carie sono: *B. dentium*, *B. inopinatum* e *B. denticolens* (ora *B. inopinatum* e *B. denticolens* sono stati ridescritti come *Scardovia inopinata* e *Parascardovia denticolens*). Non è chiaro se queste specie svolgano un ruolo nell'eziologia della carie.

E' possibile ritrovare particolari specie di bifidobatteri in periodi particolari della vita, cioè esiste una successione di specie nell'arco della vita, a seconda dell'età. *B. breve* e *B. infantis* sono specie tipiche del neonato, in particolare con allattamento al seno. Nei bambini sotto i sette anni di età sono stati isolati anche *B. longum* e *B. bifidum*. D'altra parte *B. adolescentis* è la specie caratteristica del microbiota dell'adulto con *B. longum*, *B. bifidum*, *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum*.

Con l'avanzare dell'età, il numero di bifidobatteri diminuisce significativamente, probabilmente a causa della riduzione della secrezione gastrica negli anziani.

Esistono inoltre diversi fattori che influenzano il microbiota dei bifidobatteri come: dieta, ambiente, stile di vita, stress ed anche malattie seguite da trattamenti antibiotici.

Il tratto urogenitale femminile è colonizzato da una popolazione di microrganismi fra cui i lattobacilli sono numericamente quelli dominanti. Essi favoriscono l'abbassamento del pH e così favoriscono lo sviluppo di microrganismi acido tolleranti come i lattobacilli e i bifidobatteri stessi (Biavati and Mattarelli, 2007). L'elenco delle specie che sono state isolate da habitat umano è descritto nella Fig. 8.

2.6.2 Habitat animale ed extracorporeo

Numerose specie sono state isolate dall'intestino degli animali (coniglio, pollo, vitello, suino e ratto) e dal rumine bovino (Scardovi *et al.*, 1969) (Fig. 8). Studi sulla distribuzione di queste specie, in questi *habitat*, hanno mostrato che alcune di esse sembrano essere "ospite-specifiche": *B. cuniculi*, *B. magnum* e *B. saeculare*, per esempio, sono stati isolati unicamente dalle feci di coniglio (Scardovi and Zani, 1974), *B. gallinarum* e *B. pullorum*, unicamente dall'intestino di pollo (Trovatelli *et al.*, 1974) e *B. longum* subsp. *suis*, unicamente dall'intestino di suino (Matteuzzi *et al.*, 1971). Dall'intestino delle api sono state isolate unicamente tre specie: *B. asteroides* e *B. coryneforme* (da *Apis mellifera*) e *B. indicum* (da *Apis cerana* e *Apis dorsata*) (Scardovi and Trovatelli, 1969). Dall'intestino del bombo è stata isolata *B. bombi* (Killer *et al.*, 2009)

B. minimum e *B. subtile* che erano le uniche specie ad esser state isolate dalle acque luride (Biavati *et al.*, 1982), suggerendo la possibilità che i bifidobatteri si possano sviluppare anche in nicchie ecologiche extracorporee, sono recentemente stae isolate da intestino di maiale (Simpson *et al.*, 2003) e dalla cavità orale dell'uomo (Mantzourani *et al.*, 2009).

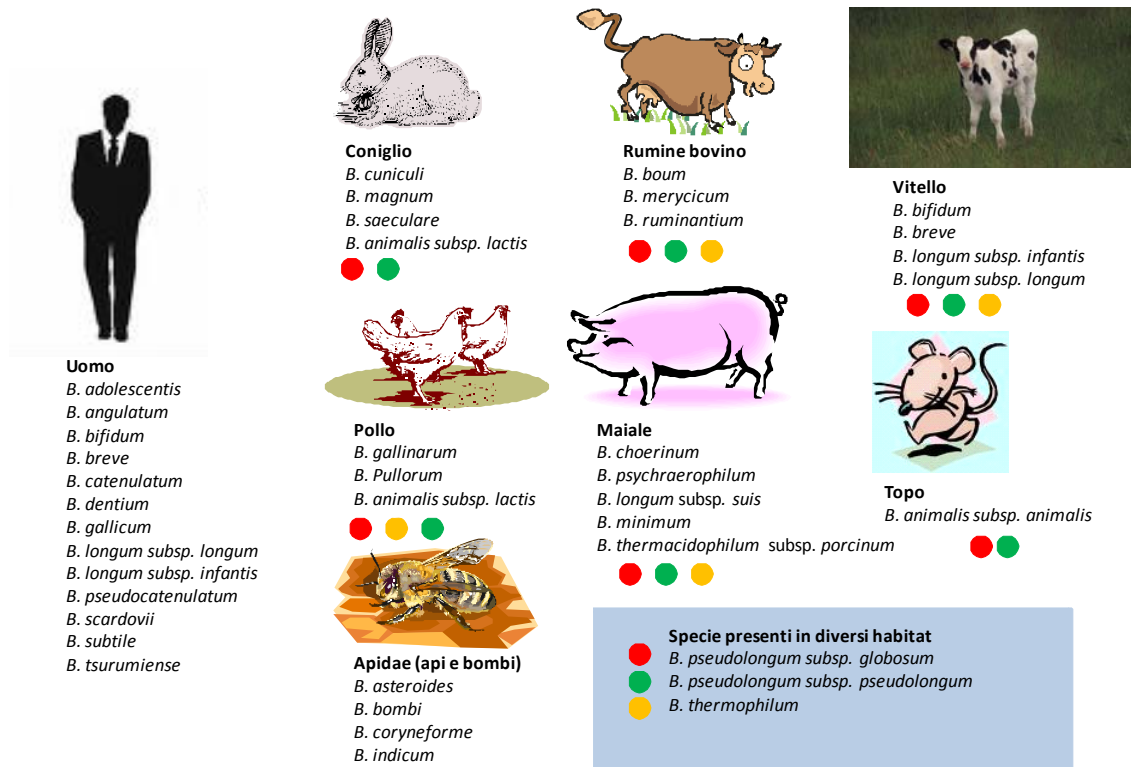


Fig. 8. Le specie del genere *Bifidobacterium* e il loro habitat.

2.7 Specie probiotiche

I bifido batteri unitamente ai lattobacilli sono considerati generi probiotici. Rispetto alle specie di *Lactobacillus*, le specie di bifidobatteri probiotiche sono meno numerose (Tabella 3), e spesso le prove cliniche sono condotte con probiotici multiceppo dove i bifidobatteri sono in combinazione con i lattobacilli.

SPECIE	HABITAT
<i>B. bifidum</i>	Human gastrointestinal tract
<i>B. adolescentis</i>	Human gastrointestinal tract
<i>B. animalis subsp.lactis</i>	Chicken gastrointestinal tract
<i>B. breve</i>	Human gastrointestinal tract
<i>B. longum subsp. infantis</i>	Human gastrointestinal tract
<i>B. longum subsp. longum</i>	Human gastrointestinal tract

Tabella 3. Elenco specie di bifidobatteri probiotici e loro habitat di origine.

I principali criteri che definiscono l'efficacia della potenzialità vantaggiosa dei probiotici sono:

- vitalità e riproducibilità su larga scala
- vitalità e stabilità durante l'uso e il confezionamento
- capacità di sopravvivenza nell'ecosistema intestinale
- effetti benefici sull'ospite.

Il meccanismo probiotico che previene i disturbi gastrointestinali non è ancora definitivamente o completamente conosciuto nonostante siano stati compiuti molti studi negli ultimi vent'anni.

I principali meccanismi includono l'antagonismo verso batteri e virus nocivi, la stimolazione dell'immunità locale e sistemica, e la modificazione dell'attività metabolica del microbiota intestinale.

Le caratteristiche essenziali per un probiotico, sono:

- adesione alle cellule intestinali umane
- stabilità all'acidità gastrica e biliare
- produzione di sostanze antimicrobiche
- attività contro i batteri patogeni.

L'adesione alle cellule intestinali è il primo passo nel meccanismo di azione probiotica. Infatti, i microrganismi probiotici sono testati per la loro capacità di colonizzare l'epitelio intestinale e, sebbene il meccanismo molecolare di adesione non sia conosciuto, le cellule batteriche idrofobe sono in grado di aderire alla superficie del tessuto.

CAPITOLO 3

3. CARATTERISTICHE DELLA SPECIE OGGETTO DI STUDIO

3.1. BIFIDOBACTERIUM PSEUDOLONGUM SUBSP. GLOBOSUM

Bifidobacterium pseudolongum subsp. *globosum* (ex *Bifidobacterium globosum*) (Scardovi *et al.*, 1969; Biavati *et al.*, 1982) è la specie del genere *Bifidobacterium* più ampiamente diffusa negli animali ed è stata isolata da feci di suinetto, vitello, ratto, coniglio e agnello; acque luride; rumine bovino e feci di bambino.

Lauer e Kandler hanno dimostrato che *B. globosum* presentava molte similitudini con *B.pseudolongum*, in particolare per quanto riguardava la morfologia, il tipo di mureina, la fermentazione dei carboidrati, il patterns elettroforetico degli enzimi, la distribuzione ecologica e solo i profili delle proteine cellulari ottenute con la PAGE erano distinguibili da quelli di *B.pseudolongum* (Lauer and Kandler, 1983).

Viste queste numerose similitudini Lauer e Kandler proposero di considerare queste due specie identiche anche se, ancora oggi, esse sono classificate come indipendenti. Recentemente, comunque, uno studio di confronto compiuto sulla composizione di basi del DNA e sulle caratteristiche fenotipiche di ceppi appartenenti alle due specie ha confermato questa similitudine ed è stata per loro proposta una nuova classificazione in due sottospecie: *B.pseudolongum* sottospecie *pseudolongum* e *B.pseudolongum* sottospecie *globosum* (Yaeshima *et al.*, 1992).

Morfologicamente *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* presenta cellule isolate, bastoncellari, sottili, incurvate, corte, con le estremità arrotondate e affusolate (Fig. 9).

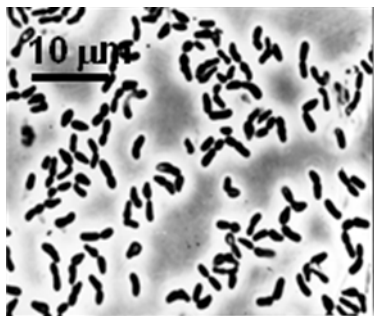


Fig. 9. *B. pseudolongum* subsp. *globosum*. Microfotografia al microscopio ottico.
Barra = 10 µm

Cresce, in infissione, in assenza di CO₂ ed in aerobiosi solo in presenza di CO₂.

Fermenta amido, arabinosio, destrina, fruttosio, galattosio, glicogeno, glucosio, lattosio, maltosio, melibiosio, raffinosio, ribosio, saccarosio, xilosio; non fermenta amigdalina, cellobiosio, esculina, inositolo, inulina, mannitolo, mannosio, melecitosisio, ramnosio, salicina, sodio-gluconato, sorbitolo, trealosio.

Non cresce in assenza di zuccheri fermentabili, nè in presenza di sodio malato al 4,5%, a 30°C.

Presenta un ottimo di temperatura fra 39°C e 40°C e non cresce nè a 20°C, nè a 46°C, il pH ottimale è fra 6,5 e 7,0 e non cresce a pH 8,0.

Il contenuto di G+C% del DNA è 64,1±0,7 (*Tm*) ed è una delle quattro specie di bifidobatteri provvista di strutture plasmidiali (Sgorbati *et al.*, 1982), la cui presenza può essere messa in relazione con la capacità di *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* di esprimere macromolecole di superficie potenzialmente coinvolte nei meccanismi di adesione. Studi condotti sulla superficie cellulare di 147 ceppi di *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* isolati da diversi *habitat* hanno, infatti, dimostrato che circa il 40% di questi ceppi presentavano proteine di parete (chiamate BIFOP = bifidobacterial outer protein), dal peso molecolare compreso fra 94,5 e 34 KDa, che non venivano espresse allo stesso modo su tutti i ceppi, ma presentavano differenze in relazione all'*habitat* da cui i ceppi erano stati isolati (Mattarelli *et al.*, 1993).

CAPITOLO 4

L'ADESIONE MICROBICA

L'adesione alla mucosa intestinale è considerata un prerequisito per la colonizzazione e un'importante caratteristica relativa alla capacità dei ceppi microbici di modulare il sistema immunitario. Pertanto l'adesione è uno dei criteri principali richiesti ad un probiotico. Numerosi modelli di mucosa intestinale sono stati utilizzati per lo studio dell'adesione dei probiotici: fra questi l'adesione al muco intestinale umano è uno dei maggiormente studiati e presenta una buona correlazione con altri modelli (Vesterlund, et al., 2005). Il livello di adesione dei probiotici e dei patogeni manifesta una grande variabilità e dipende dal ceppo, della specie e dal genere microbico (Collado et al., 2006, Aissi et al., 2001; Lee et al., 2003). La capacità di adesione dei probiotici è in stretta relazione al ceppo e la presenza di un'elevata capacità adesiva in un ceppo non sempre garantisce in vivo la persistenza e l'effetto protettivo: sono quindi necessari studi in vivo in modelli animali e umani (Gueimonde et al., 2006). Talvolta la combinazione di più ceppi probiotici promuove migliori proprietà adesive (Collado et al., 2003).

4.1 Meccanismo generale dell'adesione

Gli ambienti naturali contengono un enorme numero di superfici a cui i microrganismi possono aderire.

Dal punto di vista generale, l'adesione è un fenomeno vario e complesso, che coinvolge sia la natura della superficie sulla quale i microrganismi andranno ad aderire, che le caratteristiche fisiologiche, biochimiche e genetiche dei microrganismi interessati. Siccome sia le cellule microbiche che le superfici da colonizzare sono rivestite da uno strato di complesse macromolecole che si estendono nell'ambiente circostante, perchè l'adesione si possa verificare occorre che le macromolecole di entrambe le superfici possano interagire, ma queste interazioni sono possibili solo se le cellule batteriche riescono a vincere le numerose forze repulsive che le separano dalle superfici da colonizzare. Come si può osservare dallo schema 2 sottostante, l'adesione dei microrganismi alle superfici consiste in diversi passaggi sequenziali ed è notevolmente influenzato dalle condizioni ambientali.

Il primo dei passaggi che permettono l'adesione batterica è "l'avvicinamento" dei microrganismi alle superfici da colonizzare (riquadro 1). Questo avvicinamento è determinato dal movimento delle cellule batteriche, che può essere dovuto solo a movimenti passivi (sedimentazione, moto Browniano), se i microrganismi sono immobili, o anche a movimenti attivi (trasporto attivo, azione di flagelli o pili), se i microrganismi sono mobili (van Loosdrecht *et al.*, 1990). Per potere aderire alla superficie, comunque, un certo numero di cellule microbiche devono riuscire a superare una barriera energetica (energia di Gibbs), la cui intensità è dovuta all'azione combinata di forze elettrostatiche (G_e), che dipendono dalla carica elettrica del doppio strato ionico che si forma fra le superfici coinvolte e forze elettrodinamiche di van der Waals (G_a), che dipendono dalla dimensione delle cellule batteriche. Mentre le prime sono sempre repulsive, poichè entrambe le superfici sono cariche negativamente, le seconde diventano attrattive quando emergono dalla superficie appendici o macromolecole. L'abbassamento dell'intensità dell'energia di Gibbs è favorito dal carattere idrofobico della cellula microbica che, a sua volta, dipende dal tipo di macromolecole presenti sulla superficie. Quando le superfici cellulari hanno carattere idrofobico, generalmente, l'intensità dell'energia di Gibbs è bassa e le cellule microbiche riescono a raggiungere la superficie da colonizzare più agevolmente, mentre quando le cellule hanno carattere idrofilico, l'intensità dell'energia di Gibbs è più alta e le cellule raggiungono la superficie da colonizzare con maggiore difficoltà. Quando le cellule microbiche riescono ad avvicinarsi alla superficie da colonizzare, la colpiscono e vi aderiscono, alcune solo per un attimo (adesione reversibile), mentre altre vi rimangono attaccate per un maggiore periodo di tempo (attaccamento irreversibile) (riquadri 2 e 3). La reversibilità o irreversibilità dell'adesione è notevolmente influenzata sia dal tipo di superficie, che dalle forze coinvolte. L'adesione reversibile, infatti è favorita se le superfici sono lisce e sono coinvolte solo forze aspecifiche, a corto raggio, relativamente deboli (interazioni idrofobiche); se le superfici, invece, sono irregolari vengono coinvolte sia forze aspecifiche che forze specifiche, rappresentate da un saldo legame fra macromolecole presenti sulla superficie dei microrganismi, cioè ligandi, e macromolecole presenti sulla superficie da colonizzare, cioè recettori, è favorita l'adesione irreversibile (Ofek *et al.*, 1978; Verran *et al.*, 1991).

L'instaurarsi dei legami irreversibili permette alle cellule batteriche di aderire sempre più saldamente alle superfici, determinandone la colonizzazione vera e propria, nell'ambito della quale le cellule batteriche continuano a crescere, si moltiplicano e producono esopolimeri che si estendono all'esterno delle cellule, formando una matrice di fibre che porta alla formazione di microcolonie e biofilm (Costerton *et al.*, 1987).

4.2 Macromolecole di superficie coinvolte nell'adesione

L'adesione reversibile dei microrganismi alle superfici diventa irreversibile quando si instaurano specifiche interazioni ligando-recettore fra macromolecole presenti sulla superficie delle cellule batteriche (proteine, acidi lipoteicoici e polisaccaridi) e macromolecole presenti sulla superficie da colonizzare.

Studi sperimentali condotti da Selinger e Reed hanno dimostrato che, affinché i legandi possano riconoscere il loro specifico recettore, non basta che essi siano sintetizzati dalle cellule microbiche, ma occorre anche che siano espressi in una configurazione accessibile ai recettori (Selinger and Reed, 1979).

Le proteine coinvolte come legandi nei processi di adesione irreversibile vengono generalmente definite adesine. Nei batteri Gram-negativi esse sono comunemente localizzate a livello delle fimbrie, che sono appendici filiformi, brevi e sottili, che si estendono dalla superficie della cellula batterica verso le superfici da colonizzare dove riconoscono specifici recettori generalmente costituiti da carboidrati o glicoproteine, mentre nei batteri Gram-positivi, che non possiedono queste appendici, sono localizzate all'esterno della cellula batterica e possono essere proteine di membrana o proteine che vengono secrete dagli stessi batteri e che rimangono associate alla superficie cellulare.

Le caratteristiche strutturali dei legandi proteici identificati fino a questo momento sono stati studiati utilizzando tecniche di biologia molecolare. I risultati di questi studi hanno dimostrato che l'espressione di queste proteine è controllata geneticamente e che tutte le adesine presentano all'estremo N-terminale più o meno la stessa sequenza aminoacidica (Jones and Isaacson, 1983). Le adesine, inoltre, sono risultate composte da un numero variabile di subunità identiche, disposte in sequenza e unite fra loro da legami idrogeno ed idrofobici. Solitamente esse sono inserite in

determinati punti della parete cellulare o della membrana plasmatica, conferiscono proprietà idrofobiche alle cellule e durante l'adesione irreversibile si attaccano a specifici recettori presenti sulla superficie da colonizzare.

Fra i batteri Gram-negativi, le fimbrie del tipo 1 di *Escherichia coli* sono attualmente le più studiate: esse appaiono come sottili strutture tubulari, formate da subunità proteiche dal peso molecolare relativamente basso (20kDa), disposte con simmetria elicoidale a formare una struttura cilindrica. Oltre ad *E.coli*, le proteine fimbriali sono state identificate anche in alcuni ceppi di molti altri batteri Gram-negativi fra cui *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*. Nella maggior parte dei batteri Gram-positivi e solo in un limitato numero di batteri Gram-negativi, invece, sono stati identificati ligandi proteici afimbriali, rappresentati da proteine di membrana. Fra i batteri Gram-negativi, ligandi proteici di questo tipo, la cui espressione è indotta o repressa dalle diverse condizioni di coltura sono stati identificati in alcuni ceppi di *E.coli* enteroaggreganti (Spencer *et al.*, 1998) mentre fra i batteri Gram-positivi sono stati identificati in alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus*, in ceppi di molte specie di *Streptococcus* (*S.pyogenes*, *S.pneumoniae*) e in alcuni ceppi di *Lactobacillus* (*L.acidophilus* LB, *L.casei* GG) e *Bifidobacterium*. Questi ligandi proteici riconoscono generalmente recettori costituiti da fibrinogeno, fibronectina o carboidrati.

Oltre ai ligandi proteici, l'adesione irreversibile può essere determinata anche da altre macromolecole sempre presenti sulla superficie esterna delle cellule microbiche. In alcuni generi Gram-positivi, infatti, sono stati identificati come ligandi gli acidi lipoteicoici. Queste molecole sono costituite da ripetizioni di glicerol-fosfato e da catene laterali che possono contenere alanina, glucosio o da altre molecole diverse e sono ancorate alla superficie cellulare da legami covalenti con i glicolipidi o le proteine della membrana. Rispetto alle proteine non subiscono particolari variazioni strutturali al variare delle condizioni ambientali e sono considerati i componenti responsabili dell'idrofobicità di superficie di numerose specie microbiche, fra cui gli streptococchi appartenenti al gruppo A (*S.salivarius*, *S.mutans*) (Ofek *et al.*, 1983), in alcuni ceppi di lattobacilli e bifidobatteri.

Nei batteri Gram-negativi, dove gli acidi lipoteicoici mancano, altre macromolecole con funzione di ligandi sono state identificate nei polisaccaridi che si dispongono in

strati sovrapposti all'esterno della cellula batterica. L'adesione mediante carboidrati è stata identificata in ceppi mucosi di *Pseudomonas aeruginosa* nei quali, quando non sono presenti le fimbrie, l'adesione è assicurata proprio dall'esopolisaccaride mucoso del glicocalice, in alcuni ceppi di *Bacteroides fragilis*, oltre che in batteri Gram-positivi come *Lactobacillus* (alcuni ceppi di *L.jensenii*, *L.plantarum*).

4.3 LIGANDI DI SUPERFICIE NEI BIFIDOBATTERI

I bifidobatteri sono uno dei gruppi microbici più rappresentativi del tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali, ma per colonizzare questo *habitat* devono essere in grado di interagire con la superficie intestinale. Pur esistendo ancora pochi studi sperimentali condotti fino a questo momento sui meccanismi e le strutture coinvolte sull'adesione dei bifidobatteri, tutti i dati fino ad ora raccolti dimostrano che non tutti i ceppi appartenenti ad una determinata specie manifestano capacità adesive ma quei ceppi in grado di aderire lo devono a ligandi di natura proteica o ad acidi lipoteicoici. Ligandi proteici, che possono essere presenti sulla superficie delle cellule e/o nel mezzo di coltura, sono stati identificati da Bernet e coll. in alcuni ceppi di bifidobatteri di origine umana (*Bifidobacterium breve*, *B.longum*, *B.bifidum* e *B.infantis*). Questi studi hanno dimostrato che ceppi diversi appartenenti alla stessa specie esprimono capacità adesive diverse nei confronti delle cellule intestinali della linea Caco-2 e HT29MTX (Bernet *et al.*, 1993). Successivamente Fujiwara e coll. hanno identificato fattori proteici presenti nel terreno di coltura di alcuni ceppi di *B.longum*, *B.breve*, *B.infantis* e *B.bifidum* che permettono a questi ceppi di aderire a recettori presenti sulla mucosa intestinale umana (Fujiwara *et al.*, 1997); Mukai e coll hanno dimostrato la presenza di proteine del peso molecolare di 36 kDa e 52 kDa sulla superficie di *B.adolescentis* (ceppo BB119), ritenute responsabili dell'adesione (Mukai *et al.*, 1997) e Wagner e coll. hanno studiato la capacità di *B.animalis* di colonizzare e persistere nel tratto gastrointestinale di ratti sempre mediante ligandi proteici (Wagner *et al.*, 1997). Altri studi compiuti sul coinvolgimento dei ligandi proteici nell'adesione dei bifidobatteri sono stati effettuati da Fontaine e coll. che hanno dimostrato che *B.bifidum* (DSM20082) possiede glicosidasi in grado di riconoscere specifiche glicoproteine presenti nel muco (Fontaine *et al.*, 1997). Più recentemente Perez e coll. hanno

studiato la capacità adesiva di alcuni ceppi di origine umana dimostrando che in molti casi l'adesione era correlata alla capacità autoagglutinante di questi ceppi: ceppi con una buona capacità autoagglutinante erano anche positivi all'emoagglutinazione e manifestavano un'alta idrofobicità di superficie. Anche in questo caso il trattamento delle cellule con enzimi proteolitici fa perdere le proprietà adesive, dimostrando che i legandi sono anche per questi ceppi di natura proteica (Perez *et al.*, 1998).

Il possibile ruolo degli acidi lipoteicoici nell'adesione è stato studiato da Op den Camp e coll. in *B.bifidum* subsp *pennsylvanicum*. I dati ottenuti da questo studio suggeriscono che sia le proteine che gli acidi lipoteicoici siano coinvolti nell'incrementare l'idrofobicità delle cellule e quindi l'adesione alle cellule epiteliali del colon umano (Op den Camp, 1985a).

4.4 EFFETTO DELLE CONDIZIONI AMBIENTALI SULL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE

I microrganismi (Brown *et al.*, 1990) sono in grado di rispondere ai cambiamenti delle condizioni ambientali, modificando la struttura e la composizione della loro cellula. I fattori ambientali che maggiormente inducono una risposta da parte dei microrganismi sono variazioni nella disponibilità di nutrienti, nel pH, nella temperatura e nella concentrazione di ossigeno dell'ambiente naturale o del mezzo di coltura (Fletcher, 1984).

Fra i vari fattori abiotici sopracitati, la temperatura è sicuramente quello che maggiormente condiziona la vita e lo sviluppo dei microrganismi, poichè la loro temperatura riflette direttamente quella dell'ambiente da cui sono circondati. Eccessivi aumenti della temperatura ambientale possono risultare estremamente dannosi per i microrganismi, poichè hanno ripercussioni sulla componente proteica delle cellule, provocando la denaturazione degli enzimi, dei vettori di trasporto, delle altre proteine cellulari, oltre che sulla membrana plasmatica. Il sorprendente rinvenimento di microrganismi in grado di crescere e riprodursi in ambienti a temperature elevatissime, richiede che le loro proteine e membrane rimangano stabili al calore e questa stabilità può essere la conseguenza di successivi cambiamenti mutazionali della struttura primaria delle proteine cellulari. A differenza di quanto

succede alle alte temperature, alle basse temperature le proteine risultano tutte soggette a modificazioni conformazionali, dovute all'indebolimento dei legami idrofobi che determinano la loro struttura terziaria, che le rendono meno stabili.

CAPITOLO 5

I PROBIOTICI

5.1 IL TERMINE “PROBIOTICO”

Il termine ‘probiotico’ deriva dal greco: “pro-bios” che significa ‘per la vita’ (a beneficio della vita). Gli antenati dei batteri probiotici sono stati studiati per la prima volta da E. Metchnikoff (1845-1916) (Fig. 10), un personaggio importante nel campo della scienza.

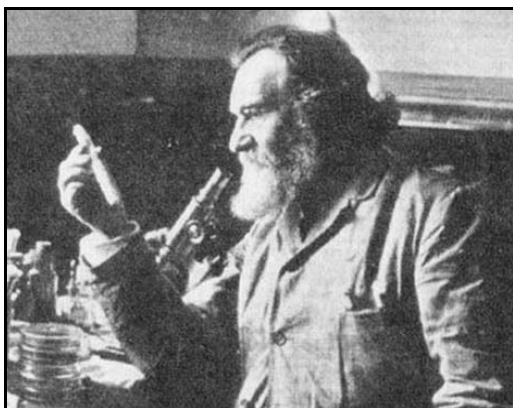


Fig. 10. E. Metchnikoff

Nel 1882 egli ha lasciato il suo paese d’origine, l’Ucraina, per lavorare a Parigi all’Istituto Pasteur. Ha incentrato i suoi studi sui processi d’invecchiamento ed ha pubblicato lavori sulle sue idee riguardanti l’intestino crasso come fonte di sostanze tossiche (ammine, ammonio), le quali danneggerebbero il sistema nervoso e vascolare nel momento in cui sono assorbite dall’intestino e circolano nel sangue. I microrganismi della flora ‘putrefattiva’ (batteri che digeriscono le proteine), che vivono nell’intestino crasso sono i produttori di quelle sostanze tossiche e sono responsabili della “autointossicazione”. Metchnikoff ha sottolineato l’importanza di un corretto bilanciamento dei vari tipi di microrganismi nell’intestino crasso ed ha notato che latticini fermentati con batteri acido lattici possono inibire la crescita dei batteri ‘putrefattivi’. Egli ha posto in rilievo in generale l’azione positiva di quei prodotti caseari nella microflora intestinale dell’uomo. Metchnikoff ha supposto nel suo trattato “The prolongation of life” (“Il prolungamento della vita”) (Metchnikoff, 1908) che la longevità dei pastori del Caucaso era attribuibile in parte al consumo di elevate quantità di latte fermentato, grazie alla presenza di lattobacilli. Le scoperte

riguardanti il metabolismo di questi batteri e la loro azione antagonista nei confronti di microrganismi nocivi spiegano il forte interesse in entrambi i campi, scientifico e commerciale. Nel 1906 una società francese “Le Ferment” ha iniziato a commercializzare un latte fermentato chiamato “Lactobacilline”. Questo prodotto caseario conteneva i ceppi batterici che Metchnikoff aveva selezionato durante le sue ricerche; qualche anno più tardi il termine “yoghourt” apparso nel dizionario “Petit Larousse”. Oggi possiamo dire che Metchnikoff è stato praticamente il precursore dell’era dei probiotici, dei prebiotici e dei cibi funzionali. Grazie alle sue ricerche, la conoscenza dei fermenti lattici si è diffusa in occidente. I fermenti lattici sono preparazioni contenenti batteri vivi che riequilibrano il microbiota intestinale. Dal punto di vista scientifico, da questi prodotti ci spostiamo nel concetto della probiosi, che è un insieme di azioni benefiche per l’intestino grazie all’attività di colture batteriche vive selezionate.

La definizione di “probiotico” ha subito alcune variazioni, da quando è stata utilizzata, la prima volta, da Lilly e Stillwell, per descrivere sostanze prodotte da un organismo, che permettevano lo sviluppo di altri organismi Lilly and Stillwell, 1965). Successivamente, Parker utilizzò questo termine per descrivere organismi e sostanze che avevano effetti benefici sull’ospite e contribuivano al mantenimento del suo equilibrio microbico intestinale (Parker, 1974), ma questa definizione presto si rivelò non adatta, perchè con il termine “sostanza” potevano essere intesi anche supplementi chimici come gli antibiotici. Nel 1989, allora, Fuller ridefinì i probiotici come “supplementi alimentari microbici vivi, che agiscono beneficamente sull’ospite, con il miglioramento del suo equilibrio microbico intestinale” (Fuller, 1989), sottolineando l’importanza della vitalità ed escludendo dalla definizione gli antibiotici ed i composti ad essi analoghi. Ancora più di recente, Huis in’t Veld e Havenaar hanno ridefinito i probiotici come “mono- o pluricolture di microrganismi vitali, che quando vengono somministrati all’uomo o agli animali apportano loro benefici, migliorando le proprietà della microflora indigena” (Huis in’t Veld and Havenaar, 1991).

Sulla base di questa definizione e delle conoscenze acquisite circa le complesse attività della micropopolazione intestinale, la comunità scientifica internazionale ha

recentemente stabilito quali debbano essere i criteri di selezione per la scelta di microrganismi ad uso probiotico:

1. devono potere essere preparati in modo utilizzabile e su larga scala;
2. devono rimanere vitali e stabili durante l'uso e l'immagazzinamento;
3. devono essere in grado di sopravvivere al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale, resistendo all'azione degli acidi gastrici e biliari, per arrivare nell'intestino in numero sufficiente (10^6 CFU/gr) (Samona and Robinson, 1991);
4. devono aderire alla mucosa intestinale, in modo da persistere nel grosso intestino almeno il tempo sufficiente per potere esercitare i propri effetti benefici sull'ospite (O'Sullivan, 1992);
5. non devono avere effetti tossici.

Per l'uomo vengono normalmente utilizzati come probiotici i lattobacilli (*Lactobacillus acidophilus*, *L.casei* e *L.delbrueckii*), da soli o in coltura con altri batteri, come i bifidobatteri (*Bifidobacterium animalis*, *B.adolescentis*, *B.bifidum*, *B.breve*, *B.longum*, *B.infantis*) e gli streptococchi (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *S.lactis*) (Tamine *et al.*, 1995).

Anche se sono ancora pochi gli studi relativi alla farmaco-cinetica dei probiotici, la maggior parte di questi mostra che i batteri dello yogurt (*Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) hanno una limitata resistenza ai succhi gastrici e alla bile, mentre ceppi di *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. sono più resistenti (Marteau *et al.*, 1993).

Il primo a suggerire l'effetto probiotico dei bifidobatteri fu Tissier, che raccomandava la somministrazione di questi microrganismi a infanti affetti da diarrea, affermando che i bifidobatteri inibissero l'azione dei batteri putrefattivi responsabili dei disordini intestinali (Tissier, 1906). Significativo è, poi, il fatto che bifidobatteri ingeriti con prodotti alimentari vengano rinvenuti nelle feci di volontari, anche qualche tempo dopo avere interrotto la somministrazione, dimostrando che essi sono in grado di persistere nel tratto gastrointestinale per un periodo più lungo che non il normale transito (Biavati *et al.*, 1995).

5.2 EFFETTI BENEFICI DEI PROBIOTICI

- Miglioramento della morfologia e la fisiologia delle pareti del tratto digestivo: i bifidobatteri sembrano influenzare la maturazione ed il turnover degli eritrociti e favorire la degradazione ed il ricambio delle mucine intestinali (Ballonge, 1993).

Inibizione dello sviluppo di batteri patogeni indesiderati: grazie alla loro presenza nell'intestino, i bifidobatteri sono in grado di prevenire la colonizzazione di altri batteri patogeni, enterici, indesiderati (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria*) (Gibbson and Wang, 1994). I meccanismi mediante i quali i bifidobatteri possono esplicare tale inibizione possono essere: la competizione per i nutrienti e/o per i recettori presenti sulla superficie delle cellule da colonizzare (Rasic, 1983) o la produzione di composti antimicrobici primari (acido acetico e lattico, con piccole quantità di acido formico) e secondari (H₂O₂ e batteriocine) con azione inibitoria. Studi sperimentali hanno evidenziato che *Bifidobacterium breve* e *B.longum* somministrati oralmente, possono avere effetti benefici nel trattamento della diarrea nei bambini, la diarrea del viaggiatore e la diarrea indotta da una terapia antibiotica (Salminen *et al.*, 1991)

- Miglioramento della tolleranza al lattosio contenuto nei prodotti del latte.

L'intolleranza al lattosio può essere dovuta sia ad una mancanza dell'enzima β-galattosidasi, nella mucosa intestinale, che ad una riduzione dell'attività dell'enzima lattasi. Studi sperimentali hanno dimostrato che prodotti alimentari a base di latte fermentato possono essere facilmente digeriti da individui intolleranti al lattosio, per via della parziale fermentazione di questo zucchero ad opera delle galattosidasi microbiche, che suppliscono alle carenze dell'ospite (Jiang and Savaiano, 1997). Inoltre, l'utilizzo di preparati a base di bifidobatteri da parte di pazienti affetti dalla malattia di Crohn, in cui si denotano bassi livelli di β-D-galattosidasi, hanno evidenziato miglioramenti nel quadro clinico (Faver *et al.*, 1997).

- Attività antitumorale. Le azioni antimutagenica o anticarcinogenica dei bifidobatteri possono essere dovute, sia all'inibizione degli enzimi che convertono i procarcinogeni in carcinogeni (β-glucuronidasi, azoreduttasi e nitroreduccasi) (Goldin and Gorbach, 1984), che alla sintesi di specifici metaboliti che inibiscono i procarcinogeni (nitriti, nitrosamine e amine eterocicliche) assunti con la dieta (Chung

et al., 1992; Renner and Munzner, 1991). Pur essendoci molti studi sperimentali condotti su animali che dimostrano l'effetto dei bifidobatteri sulla rimozione dei procancerogeni: *B.longum*, per esempio, è in grado di ridurre lo sviluppo di tumori al fegato nei ratti (Singh *et al.*, 1997), i dati clinici disponibili sull'uomo sono ancora troppo limitati.

- Riduzione dei livelli di colesterolo nel sangue. L'effetto dei bifidobatteri sull'abbassamento del livello del colesterolo nel sangue è ancora oggi difficile da dimostrare con certezza. L'ipotesi attualmente più accreditata è quella che la riduzione del livello del colesterolo nel sangue sia dovuta alla produzione da parte dei bifidobatteri di acidi organici, che inibiscono la sintesi del colesterolo. Studi sperimentali compiuti *in vitro* hanno, inoltre, dimostrato che alcuni ceppi di bifidobatteri sono in grado di deconiugare gli acidi biliari, ma questi studi non hanno ancora avuto conferme *in vivo* (Gilliland, 1990).
- Stimolazione del sistema immunitario dell'ospite. I bifidobatteri sembrano in grado di stimolare il sistema immunitario dell'ospite agendo sui macrofagi, sui linfociti, sulle immunoglobuline A e sull'interferone- γ (Fernandes *et al.*, 1990; Perdigon *et al.*, 1990; de Simone, 1986).
- Sintetisi di vitamine del complesso B (tiamina, riboflavina, vitamina B6) e K, aminoacidi (alanina, valina, acido aspartico e treonina) e acido lattico solo nella forma L(+).
- Aumento dell'assorbimento del calcio.

CAPITOLO 6

MATERIALI e METODI

6.1 Ceppi utilizzati

Nell'ambito di questo lavoro sono stati utilizzati ceppi appartenenti alla specie *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, isolati dal tratto gastrointestinale del rumine bovino: Ru 809/1, plasmide positivo e Ru 809/8, plasmide negativo.

6.2. Terreni di coltura

I ceppi di *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* sono stati coltivati utilizzando il substrato base Tryptone-Phytone-Yeast Extract liquido (TPY), suggerito da Scardovi (1986) così modificato: 10 g/l triptone (Tryptone Peptone Bios D-Biolife); 5g/l peptone (Soy Peptone-Biolife); 15 g/l glucosio; 2,5 g/l estratto di lievito (Biolife); 0,5 ml/l Tween 80 (Merck); 0,5 g/l cisteina cloridrata (Merck); 1,5g/l K_2HPO_4 (Merck); 0,5 g/l $MgCl_2 \times 6H_2O$ (Merck). Il substrato è stato portato a pH finale 6,5 e sterilizzato a 110°C per 30'.

6.3 CONDIZIONI DI INCUBAZIONE

Le colture dei ceppi di bifidobatteri sono state incubate a 37°C in giare per anaerobiosi BBL Gas Pack (Bekton Dickinson Microbiology System, Cokeleyville MD, USA), con il sistema Anaerocult A (Merck), per 24 ore.

Le colture di *E.coli* sono state incubate in termostato a 37°C, in leggera agitazione.

6.4 CONSERVAZIONE DELLE COLTURE

Per potere disporre dei ceppi per l'intera durata della ricerca, essi sono stati conservati a -135°C. Le colture sono state centrifugate a 12000 x g per 10', private del sopranatante e risospese in 1ml di crioprotettore così composto: per 100ml di soluzione: 10g skim milk (Biolife); 3g lattosio; 0,3g estratto di lievito (Biolife); sterilizzato a 110°C per 30'. Dopo la sterilizzazione è stata aggiunta al crioprotettore la vitamina C (10%). Le sospensioni cellulari sono state dispensate in cryovials sterili da 3ml (1ml per ciascuno) e conservate a -135°C.

Oltre al congelamento è stata assicurata anche la conservazione a lungo termine, mediante liofilizzazione. Come per la conservazione a -135°C , le colture sono state centrifugate, private del soprannatante e risospese in 1ml dello stesso tipo di crioprotettore. Le sospensioni cellulari sono state dispensate in fiale di vetro, che sono state mantenute a -135°C fino al momento della liofilizzazione. Questa è stata eseguita mediante uno strumento Speedi VAC Model 5PS Edwards High Vacuum LTD.

Al bisogno, la coltura congelata o liofilizzata, è stata utilizzata inoculando sterilmente una piccola quantità di preparato in un tubo con 10ml di substrato liquido, poi messo ad incubare.

6.5 DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA

I preparati fotografici sono stati allestiti prelevando 1 ml di liquido colturale, che poi è stato centrifugato in "eppendorf". Il deposito cellulare è stato adeguatamente spatolato sulla superficie di un vetrino copri-oggetto in una microgoccia di acqua distillata. I preparati sono stati fissati mediante tre successivi rapidi passaggi sulla parte più alta di una fiamma ad alcool. Le microfotografie sono state ottenute mediante un apparato fotografico Contax, collegato al microscopio, utilizzando una pellicola 35mm AGFA COPE Repoid A.H.U. Le stampe sono state fatte su carta ILFO SPEED RCIS5 1M RC de Luxe (ILFORD).

6.6 CRESCITA ALLE DIVERSE CONDIZIONI AMBIENTALI

6.6.1 Coltura a pH costante

Colture da 100 ml di TPY con 0.5% di glucosio cresciute per 12 ore sono inoculate in 1000 ml di TPY sempre allo 0.5% portate a pH 4.6, 5.5, 6.0 addizionandole con 6 ml, 3.5 ml, e 2.0 ml, rispettivamente, di acido lattico al 30%. Viene allestita anche una coltura da 1000 ml di TPY con 0.5% di glucosio a pH 7.5 portato a pH con NaOH 1M. Le colture sono state incubate a 37°C per 10 ore mantenendo il pH iniziale costante tramite addizione di NaOH 1M mediante pH control Unit LKB (Biotech Lp-100-3) che regolava l'immissione di NaOH 1M in base all'aumento di acidità prodotta durante la crescita batterica. Ogni coltura è stata addizionata anche di

2.5 ml di NaHCO_3 , per favorire l'anaerobiosi. Le colture sono mantenute in debole agitazione per favorire la miscelazione omogenea della NaOH addizionata. Al termine dell'incubazione le colture sono rapidamente raffreddate in bagno di ghiaccio e centrifugate a $2000 \times g$ per 10 min. Le cellule sono state lavate in BRIDE e sonicate per ottenere gli estratti cellulari (vedi 6.7 Preparazione pareti).

6.6.2 Coltura in NaCl.

E' stato utilizzato il substrato TPY che contiene una quantità di NaCl pari allo 0.12%. TPY (tryptone cod. N. 412290; soy peptone cd. N. 412325, yeast extract cod. N. 412220, Biolife s.r.l. Milano, Italy). Le cellule di Ru 809/1 e Ru 809/8 sono state coltivate in TPY addizionato di quantità crescenti di NaCl (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 1.75, 2.5, 3.2, 6.4 %) a 37°C in anaerobiosi. Lo sviluppo delle colture è stato valutato mediante lettura spettrofotometrica.

6.6.3 Coltura in TPY diluito

Le cellule sono state coltivate in TPY diluito 1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 6:10.

6.6.4 Coltura in Desferal

6.6.5 Coltura a diverse concentrazioni di glucosio.

I ceppi sono stati coltivati in 1l di TPY addizionato con 0.25 ml di NaHCO_3 al 10% e con diverse concentrazioni di glucosio in diverse concentrazioni di glucosio (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.25, 1.5, 3.6, 5.4, 7.2, 9.0, 10.8, 12.6, 16.2, 18.0 e 36.0 %). L'inoculo iniziale corrispondente al 10 % derivava da una coltura già cresciuta nello zucchero corrispondente. Le beute sono poi state incubate a 37°C per 24 ore. La coltura nei diversi zuccheri è stata ripetuta per 3 volte.

6.6.6 Coltura in diversi zuccheri

I ceppi sono stati coltivati in 1l di TPY addizionato con 0.25 ml di una soluzione di NaHCO_3 al 10% (sterilizzata per filtrazione) e con i diversi zuccheri (fruttosio, galattosio, glucosio, lattosio, maltosio, melibiosio, raffiniosio, ribosio, saccarosio e xilosio) all'1.5 %. L'inoculo iniziale corrispondente al 10 % derivava da una coltura

già cresciuta nello zucchero corrispondente. Le beute sono poi state incubate a 37°C per 24 ore. La coltura nei diversi zuccheri è stata ripetuta per 3 volte.

6.7 Preparazione degli estratti cellulari totali, degli estratti cellulari citoplasmatici e delle pareti cellulari.

Le cellule dei campioni di *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum*, derivate da almeno 0,5 l di coltura cellulare liquida, cresciute alle diverse temperature, sono state raccolte per centrifugazione e lavate per tre volte in tampone fosfato salino (PBS: Na₂HPO₄ x 12 H₂O 8mM, KH₂PO₄ 2mM, NaCl 0,14mM, KCl 3mM, pH 7,0). Le cellule sono, poi, state sospese sempre in PBS, nel rapporto di 1gr di cellule per 2ml di tampone e sono state rotte, utilizzando un sonicatore Braun Labsonic 1510, con tre colpi di 40 secondi, intervallati da pause di 120 secondi. La rottura delle cellule è stata verificata mediante osservazione microscopica. L'estratto cellulare sonicato è, poi, stato suddiviso in tre frazioni di circa 1ml ciascuna: una frazione è stata conservata come estratto cellulare totale; la seconda frazione è stata centrifugata a 55000 x g, per 30' ed è stata conservata come estratto cellulare citoplasmatico; la terza frazione è stata diluita 1:4 in PBS e sottoposta a ripetute centrifugazioni a 2000 x g, per 5'-6'. Dopo ognuna di queste è stato conservato il supernatante ed il pellet è stato risospeso in tampone e ricentrifugato. Il "pool" dei sopranatanti ottenuti da queste ripetute centrifugazioni è stato, quindi, a sua volta ricentrifugato a 55000 x g ed il pellet ottenuto è stato lavato con PBS e risospeso in 0,25-0,5 ml dello stesso tampone, costituendo il preparato delle pareti cellulari.

6.8 Determinazione quantitativa delle proteine La determinazione delle proteine è stata effettuata mediante il metodo di Lowry et al., 1951.

6.9 Elettroforesi su gel di poliacrilamide in gradiente lineare (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

a) Preparazione dei reagenti:

1. Gel di separazione con gradiente 8-20%.

Soluzione con acrilamide al 20%: acrilamide 20% (p/v) (BIORAD) e N-N'-metilen-bis-acrilamide 0,5% (p/v) (BIORAD) sono state sciolte in tampone Tris-HCl 0,37M (pH 8,8). Alla soluzione è stato aggiunto SDS 0,1% (p/v) (BIORAD), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamine) 0,025% (v/v) (BIORAD) e ammonio persolfato 0,05% (p/v) (BIORAD).

Soluzione con acrilamide all'8%: acrilamide 8% (p/v) (BIORAD) e N-N'-metilen-bis-acrilamide 0,21% (p/v) (BIORAD) sono state sciolte in tampone Tris-HCl 0,37M (pH 8,8). Alla soluzione è stato aggiunto SDS 0,1% (p/v) (BIORAD), TEMED 0,025% (v/v) (BIORAD) e ammonio persolfato 0,05% (p/v) (BIORAD).

Le due soluzioni sono state miscelate all'uscita di un apparecchio "Gradient Former" (modello 385, BIO-RAD) e sono state convogliate, nell'interspazio posto fra due lastre di vetro, precedentemente montate (16X20 cm), alla velocità di 2,5 ml/min, mediante una pompa peristaltica "Multiperpex" (modello 2115, LKB), collegata ad un tubicino dal diametro interno di 3mm, terminante con un ago. Il gel di separazione è stato, poi, ricoperto in superficie con 3ml di una soluzione di SDS 0,1% (p/v) che, a polimerizzazione avvenuta, è stata sostituita con il gel di avvio.

2. Gel di avvio.

Acrilamide 3% (p/v) (BIORAD) e N-N'-metilen-bis-acrilamide 0,08% (p/v) (BIORAD) sono state sciolte in tampone Tris-HCl 0,1M (pH 6,8). Alla soluzione è stato aggiunto SDS 0,1% (p/v) (BIORAD), TEMED 0,05% (v/v) (BIORAD) ed ammonio persolfato 0,2% (p/v) (BIORAD).

3. Tampone di corsa: Tris-HCl 0,017M, glicina 0,192M (BIORAD), SDS 0,1% (p/v) (BIORAD); pH 8,3.

4. Soluzione di fissaggio: acido tricloroacetico 12% (p/v) e acido solfosalicilico 3,5% (p/v).

5. Soluzione decolorante: etanolo 25% (v/v) ed acido acetico 8% (v/v).

6. Soluzione colorante: etanolo 25% (v/v), acido acetico 8% (v/v), Coomassie Brilliant blue (R-250) 0,10% (p/v) (BIORAD).

b) Procedura:

I campioni (estratti cellulari totali, estratti citoplasmatici e preparati di parete), sono stati diluiti nelle proporzioni 1:1 in tampone Tris-HCl (pH 6,8), contenente: SDS 8% (p/v) (BIORAD), glicerolo 33% (v/v) (BIORAD), 2-mercaptoetanololo 10% (v/v)

(BIORAD), blu bromofenolo 0,05% (BIORAD) e sono stati bolliti per 6'-8'. A questo punto, sono stati caricati direttamente nei pozzetti del gel di avvio (50µg proteine/pozzetto).

La migrazione elettroforetica è stata eseguita a 4-5°C, a corrente costante di 60 mA, in tampone di corsa, in una cella elettroforetica "Protean II" (BIORAD), utilizzando come standard l' SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Hight, Low and Broad Range (BIORAD).

A corsa ultimata il gel è stato trattato mediante bagni successivi in diverse soluzioni: prima è stato messo nella soluzione di fissaggio per 30'-60'; quindi è stato lavato nella soluzione decolorante, per 5' e successivamente è stato posto nella soluzione colorante, per 20'-30'. Il gel è, poi, stato decolorato mediante numerosi passaggi nella soluzione decolorante, fotografato e conservato in buste di plastica sigillate.

6.10 Trasferimento su filtri di nitrocellulosa

Le proteine, separate mediante elettroforesi SDS-PAGE, sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa "Millipore GS" (MILLIPORE), con pori del diametro di 22µm.

Il gel è stato lavato per 30' in tampone di blottaggio (Tris-HCl 25mM, glicina 192mM (BIORAD), metanolo 20% (v/v), pH 8,3), poi è stato posto a contatto con la membrana di nitrocellulosa, facendo attenzione ad allontanare tutte le bolle di aria. Il tutto è stato collocato, in posizione verticale, all'interno di una cella "Trans-Blot" (BIORAD) ed è stato coperto con il tampone di blottaggio. Il trasferimento delle proteine, dal gel alla membrana di nitrocellulosa, è stato eseguito a 7°-8°C, mediante un alimentatore modello 160/1,6 (BIORAD), a voltaggio variabile: inizialmente a 30V, per tutta la notte, poi a 90V, per due ore. A trasferimento avvenuto, le membrane blottate sono state asciugate all'aria e conservate in contenitori con CaCl₂, a 4°C.

6.11 Preparazione degli antisieri policlonali (anticorpi I¹)

Gli antisieri policlonali sono stati prodotti in conigli di razza New Zealand, mediante 8-10 successive iniezioni intradermiche sulla schiena (100µl). Ogni iniezione

conteneva 100-150µg di antigene, mescolati all'adiuvante di Freund. Dopo 8-10 settimane, i conigli sono stati dissanguati ed il sangue è stato centrifugato, per ottenere l'antisiero contenente gli anticorpi desiderati. L'antisiero così ottenuto è stato fatto precipitare con ammonio solfato e conservato come liofilizzato, o congelato a -20°C, in presenza di azide allo 0,02%.

6.12 Analisi immunologica delle proteine blottate.

Per individuare il legame antigene-anticorpo è stato utilizzato il kit "Immuno-Blot GAR-AP"(BIORAD). La membrana è stata immersa in TBSG (20mM Tris, 500mM NaCl, 3% gelatina, pH 7,5), a temperatura ambiente, per 30'-60', in leggera agitazione. Dopo successivi lavaggi di 5', a temperatura ambiente, in tampone TTBS (20mM Tris, 500mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5), la membrana è stata incubata con l'anticorpo primario specifico (diluito 1:2500-1:15000 in TTBS, contenente gelatina all'1%), per tutta la notte, a temperatura ambiente. Dopo due lavaggi di 10' ciascuno in TTBS, la membrana è stata incubata per 1 ora, a temperatura ambiente, in leggera agitazione, con l'anticorpo secondario (Goat anti-Rabbit IgG - Alkaline Phosphatase Conjugate - BIORAD), diluito 1:3000 in TTBS, contenente gelatina all'1%. Dopo due ulteriori lavaggi: uno in TTBS, per 10' ed uno in TBS, per 5', la membrana è stata incubata nella soluzione di sviluppo HRP, allestita secondo le indicazioni allegate al kit GAR-HRP (Immun-Blot-Goat Anti-Rabbit-Horseradish Peroxidase BIORAD), per 30'-40'. La reazione è stata bloccata immergendo la membrana in H₂O distillata per 10'. Le proteine legate all'anticorpo sono state evidenziate come macchie violacee. Le membrane sono poi state fotografate, asciugate e conservate al buio.

6.13 Saggi di idrofobicità

- Cromatografia ad interazione idrofobica (HIC) (Smyth *et al.*, 1978 e Faris *et al.*, 1981)

Preparazione dei campioni: le cellule, derivate da colture liquide, cresciute alle diverse temperature, sono state raccolte per centrifugazione, lavate in tampone PBS e risospese in tampone ammonio solfato (BAS: ammonio solfato 1M in tampone fosfato di sodio 10mM; pH 6,8), fino ad ottenere una OD₅₅₀ di 0,5.

Preparazione delle colonne: le colonne sono state allestite utilizzando siringhe di plastica da 1ml e dal diametro interno di 5mm, tagliate all'altezza di 35mm e chiuse nella parte inferiore con uno strato di materiale inerte poroso. Gli spezzoni delle siringhe sono stati impaccati con 150µl di resina Octil-sefariosio CL-4B (Pharmacia-LKB) (40µmol/ml) e lavati con 3ml di tampone BAS.

Procedura: 100µl di sospensione cellulare, diluita in 3ml di BAS, sono stati introdotti molto lentamente in ogni colonnina e l'eluato è stato letto allo spettrofotometro (OD₅₅₀). L'idrofobicità è stata valutata in base alla quantità di cellule trattenute dal gel, che è data dalla diminuzione percentuale della densità ottica dell'eluato rispetto a quella del campione iniziale (maggiore era la diminuzione dell'OD, maggiore era l'idrofobicità delle cellule).

- Agglutinazione con ammonio solfato (SAT) (Lindahl *et al.*, 1981).

Preparazione dei campioni: le cellule, derivate da colture liquide, cresciute alle diverse temperature, sono state raccolte per centrifugazione, lavate in tampone PBS 0,002M (pH 6,8) e risospese nello stesso tipo di tampone, fino ad ottenere una concentrazione finale di circa 10⁸ cellule/ml.

Reagenti: sono state preparate una serie di soluzioni stock di PBS + ammonio solfato, a diverse concentrazioni comprese fra 0,02M e 4,0M, con intervalli di 0,025M.

Procedura: aliquote di 25µl di sospensione cellulare sono state mescolate, separatamente, ad uguali volumi delle diverse soluzioni stock di PBS + ammonio solfato. La mescolanza è stata allestita su vetrini da microscopio con un avvallamento centrale, mantenuti in agitazione manualmente per 1'-2'. Il grado di agglutinazione è stato valutato osservando la sospensione su uno sfondo nero. Come controllo negativo è stata utilizzata un'aliquota di sospensione cellulare, mescolata al tampone PBS senza ammonio solfato. La più bassa concentrazione di soluzione stock in grado di determinare l'agglutinazione batterica è stata indicata come valore del livello di idrofobicità.

6.14 Trattamento con tripsina

Le cellule, derivate da colture liquide, cresciute alle diverse temperature, sono state raccolte per centrifugazione e lavate in tampone Tris-HCl 0,01M (pH 7,5). Due aliquote di 100 µl ciascuna di sospensione cellulare sono state risospese in 200µl dello stesso tipo di tampone, con 2mg/ml (circa 220 unità totali) di tripsina (Boehringer). Come controllo negativo due aliquote di 100µl di sospensione batterica sono state mantenute nello stesso tipo di tampone, ma senza l'aggiunta della tripsina. Dopo incubazione a 37°C, per 2 ore, le cellule di ogni aliquota sono state lavate due volte in tampone PBS e risospese, un'aliquota, in 100µl di BAS, per la valutazione dell'HIC e l'altra aliquota in 100µl di PBS + ammonio solfato, per la valutazione del SAT.

6.15 Elettroforesi delle proteine native:

- Analisi elettroforetica delle proteine cellulari totali (Moore *et al.*, 1980)

a) Preparazione dei reagenti:

1. Gel di separazione (8,5%): 24,4g acrilamide (BIORAD) e 0,64g N-N'-metilen-bis-acrilamide (BIORAD) sono stati sciolti in 250ml di tampone TRIS-HCl 0,4M (pH 8,8) e dopo filtrazione e raffreddamento, sono stati aggiunti 250µl di TEMED (BIORAD) e la soluzione è stata conservata, al buio, a 4°C. Al momento della preparazione del gel, a 45ml della soluzione sono stati aggiunti 0,35ml di ammonio persolfato 10% (p/v) (BIORAD) e la soluzione è stata aspirata in una siringa, degasata manualmente per due volte e versata fra le lastre di vetro precedentemente montate.

2. Gel di avvio (4,7%): 3,5g acrilamide (BIORAD) e 0,1g N-N'-metilen-bis-acrilamide (BIORAD), sono stati sciolti in 70ml di tampone TRIS-HCl 0,2M (pH 7,0) e dopo filtrazione e raffreddamento, sono stati aggiunti 2,5ml di blu di bromofenolo 0,25% (p/v) (BIORAD) e la soluzione è stata conservata al buio a 4°C. Al momento della preparazione del gel, a 10ml della soluzione sono stati aggiunti 10µl di TEMED (BIORAD) e 0,25ml di ammonio persolfato al 10% (p/v)

(BIORAD) e la soluzione è stata aspirata in una siringa, degasata manualmente e versata fra le lastre di vetro, sopra il gel di separazione, già polimerizzato.

3. Tampone di corsa: 3gr/l TRIS; 15gr/l glicina (BIORAD).
4. Soluzione di fissaggio: acido tricloroacetico 12% (p/v).
5. Soluzione decolorante: etanolo 25% (v/v) ed acido acetico 10% (v/v)
6. Soluzione colorante: metanolo 25% (v/v), acido acetico 10% (v/v), Coomassie Brilliant blue R-250 0,10% (p/v) (BIORAD)

b) Procedura:

Le cellule, derivate da colture di 24 ore, cresciute in 10ml di TPY, in anaerobiosi, sono state raccolte per centrifugazione e sono state risospese in 0,15ml di TRIS-HCl 0,2M (pH 7,0). Alla sospensione sono state aggiunte circa 0,15g di sferette di vetro dal diametro variabile da 75 a 110 μ m e le cellule sono state rotte, per 6', utilizzando un agitatore meccanico. Le pareti cellulari e le eventuali cellule residue sono state fatte sedimentare mediante centrifugazione ed il soprannatante, addizionato di circa 20mg di saccarosio, è stato caricato nei pozzetti del gel di avvio (40 μ l/pozzetto).

La migrazione elettroforetica è stata eseguita a 15°C, a voltaggio costante di 200V, in tampone di corsa, in una cella elettroforetica "Protean II" (BIORAD), utilizzando come standard il ceppo R101-8^T (ATCC 25527).

A corsa ultimata il gel è stato trattato mediante bagni successivi in diverse soluzioni: prima è stato messo nella soluzione di fissaggio per 30', quindi è stato lavato nella soluzione decolorante, per 5' e successivamente è stato posto nella soluzione colorante, per 30'. Il gel è, poi, stato decolorato mediante numerosi passaggi nella soluzione decolorante, fotografato e conservato in buste di plastica sigillate.

CAPITOLO 7

7. RISULTATI e DISCUSSIONE

7.1 Coltura a pH costante

7.1.1 Effetto pH sulle BIFOP C e H

Nella prova di influenza del pH sull'espressione delle proteine di parete, BIFOP C e H, le cellule sono state coltivate in TPY con una concentrazione di glucosio dello 0.5 % rispetto allo 1.5% normalmente utilizzato. Questa concentrazione di glucosio è già stata studiata con colture a pH non costante e non ha messo in evidenza variazioni dei profili proteici di parete. Inoltre dai dati stechiometrici di produzione di acido lattico e acetico nel metabolismo dei bifidi si avrebbe ogni 500 ml di substrato contenente 0.5 % di glucosio un consumo di circa 33 ml di NaOH 1 M (= 0.7 g di Na TOTALE in 500 ml) che quindi sarebbe la quantità di NaOH da utilizzare per neutralizzare l'acidità prodotta e quindi per mantenere un pH costante.

Considerando 500 ml di substrato con concentrazioni di glucosio normale (1.5 %) il mantenimento a pH costante richiederebbe un'aggiunta di quasi 100 ml di NaOH 1M: l'aggiunta di un tale volume di NaOH comporterebbe un aumento di volume totale con diluizione del substrato con anche un aumento del Na che potrebbe avere effetti sull'espressione delle proteine parietali ancora non noti. Nello studio dell'influenza dell'NaCl in quantità variabili, infatti, è stato osservato che esso determina variazioni a livello di proteine di parete: ad esempio 33 ml di NaOH 1 M aggiunti a 500 ml di substrato corrispondono (come Na e non come NaCl) allo 0.4 % di NaCl e lo 0.4 % di NaCl (è dovuto al Na⁺ o al Cl⁻ ?) ha già un effetto notevole sulla proteina LMW. (in realtà già lo 0.1 % di NaCl ha effetto sulla BIFOP H)

Le colture hanno richiesto le seguenti quantità di NaOH 1 M addizionate per il mantenimento del pH costante e le quantità di masse cellulari ottenute sono descritte in Tabella 4.

Tabella 4. pH iniziali e finali, quantità di NaOH 1 mM addizionata e masse cellulari delle colture del ceppo Ru 809/1.

pH iniziale	pH finale dopo 10 ore di coltura	Consumo di NaOH	Massa cellulare valutata come peso umido
4.6	4.8-4.9	10 ml	1.2 g
5.5	5.7-5.8	34 ml (corrisponde a	2.5 g

		circa 700 mg di NaOH per 500 ml)	
6.0	6.3-6.4	33 ml	3.9 g
7.5	7.3-7.4	34 ml	5.4 g

La crescita a pH controllato ha messo in evidenza che l'effetto non è sulla quantità totale delle proteine BIFOP C o H che sono circa uguali nel preparato dell'estratto totale ma sulla traslocazione in parete come è messo in evidenza nel gel PAGE colorato con Coomassie (Fig. 11).

1 2 3 4 5 6 7 8

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 11. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie. Estratti totali (1, 3, 5 e 7) e preparati parietali (2, 4, 6 e 8) di Ru 809/1 coltivato ia diversi pH. 1 e 2, pH 4.8-4.9; 3 e 4, pH 5.7-5.9; 5 e 6, pH 6.3-6.4; 7 e 8, pH 7.4-7.5.

Data la minore sensibilità della rivelazione delle proteine della colorazione Coomassie dei gel PAGE, la presenza di proteine di parete si mette in evidenza solo nelle cellule cresciute a pH 5.7-5.8 nel gel elettroforetico mentre con la rivelazione immunologica si osserva che in realtà le proteine di parete sono presenti a tutti i pH saggiati ma con minore quantità rispetto al pH 5.7-5.8 (Fig. 12).

1 2 3 4 5 6 7 8

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 12. Western blot decorato con anti BiFOP C e anti-BIFOP H. Preparati di parete di Ru 809/1 coltivato a diversi pH. 1 e 5, pH 4.8-4.9; 2 e 6, pH 5.7-5.8; 3 e 7, pH 6.3-6.8; 4 e 8, pH 7.3-7.4. Profili 1-4, 20 µg di proteina/ 5 µl; profili 5-8, 5 µg di proteine/5 µl.

Le frazioni di parete di BIFOP C e H sono influenzate entrambe e nello stesso modo da variazioni di pH. Come messo in evidenza dalla Fig. (PImm 117) se poniamo la BIFOP C e la BIFOP H prodotte a 5.7-5.8 come il 100% avremo nelle cellule cresciute a differenti pH, le percentuali espresse in Tabella 5.

	pH 4.8-4.9	pH 5.7-5.8	pH 6.3-6.4	pH 7.3-7.4
BIFOP C	20	100	50	10-20
BIFOP H	5-10	100	40	5

Tabella 5. Valutazione quantitativa dell BIFOP H e C determinata mediante analisi desitometrica.

Ponendo 100 % la BIFOP C nel preparato di parete si deve porre 700 % la sua quantità nell'estratto totale.

7.1.2 Prove di idrofobicità a diversi pH

Il saggio SAT TEST per valutare l'idrofobicità delle cellule non mette in evidenza una correlazione fra presenza quantitativamente elevata di BIFOP C ed H sulle pareti e valori di idrofobicità: infatti le cellule cresciute a pH 5.5 che esprimono la massima quantità di BIFOP hanno la stessa idrofobicità di quelle cresciute a pH 7.5 che invece rivelano scarsa quantità di BIFOP sulle pareti. Le cellule cresciute a pH 4.6 che presentano anch'esse alte BIFOP sono addirittura autoagglutinanti rivelando cioè una idrofobicità molto elevata (Tabella 6).

	Concentrazioni molari di $\text{NH}_4(\text{SO})_4$									
pH	0.5	0.6	0.7	0.8	1.0	1.5	1.6	1.7	1.8	2.0
4.6	autoagglutina									
5.5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6.0	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7.5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabella 6. SAT test del ceppo Ru 809/1 coltivato a diversi pH.

7.2 Coltura in NaCl

7.2.1 Effetto NaCl sullo sviluppo di Ru 809/1 e Ru 809/8.

Sono state saggiate le concentrazioni di NaCl allo 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 1.75, 2.5, 3.2, 6.4 %. Considerando che la concentrazione di NaCl presente nel TPY normale è di 0.12 % in base alla somma del NaCl presente nei vari costituenti del TPY calcolata in base ai valori espressi nei foglietti illustrativi relativi, tale concentrazione è stata considerata normale. La concentrazione di NaCl influisce sullo sviluppo delle colture di Ru 809/1 e Ru 809/8 che sono completamente inibite alla concentrazione di 6.4 %; dopo 24 ore di incubazione a 37°C in anaerobiosi a 3.2 % Ru 809/8 raggiunge uno sviluppo inferiore a quello di Ru 809/1 (lettura a 600 nm 0.840 e 1.140, rispettivamente). Ru 809/1 è pertanto più osmofilo di Ru 809/8.

A concentrazioni minori di NaCl, 1.8 e 2.4 %, lo sviluppo di Ru 809/8 è più lento di quello di Ru 809/1 ma raggiunge livelli uguali a quello di Ru 809/1.

L'aumentata concentrazione di NaCl da 0.12 a 1.5 % non altera la curva di sviluppo dei due ceppi rispetto ai controlli.

7.2.2 Effetto NaCl sulle proteine di parete

In Ru 809/8 cresciuto alle diverse concentrazioni di NaCl si mette in evidenza l'assenza di proteine parietali e la presenza della BIFOP B sia nel sovranante sia nel totale. Non sono stati osservati, pertanto, cambiamenti rispetto alla coltura in condizioni normali.

In Ru 809/1 è stata messa in evidenza nel saggio immunologico una progressiva diminuzione fino alla scomparsa della BIFOP H nella parete dalle cellule coltivate dalle concentrazioni di 0.12 % a quelle di 1.75 % di NaCl ed ad un suo corrispondente aumento nel sovrantante (Fig. 13). Anche la BIFOP C decresce fino a scomparire nella parete delle cellule coltivate a 1.75% di NaCl mentre aumenta nel sovranante (Fig. 13).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

BIFOP C

BIFOP H

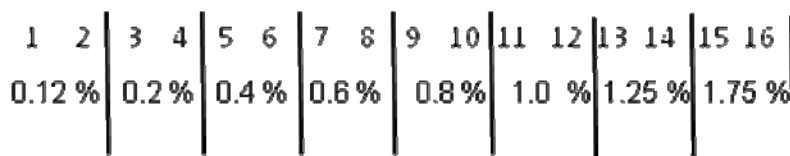


Fig. 13. Western blot decorato con anti BiFOP C e anti-BIFOP H. Sovranante (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) e preparati di parete (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) di Ru 809/1 coltivato a diverse concentrazioni di NaCl: 1, 2, 0.12 %; 3 e 4, 0.2 %; 5 e 6, 0.4 %; 7

e 8, 0.5 %; 9 e 10, 0.8 %; 11 e 12, 1.0 %; 13 e 14, 1.25 %; 15 e 16, 1.75 %. Ogni profilo contiene 10 mg di proteine/5 ml.

Alle concentrazioni di 2.5 e 3.2 % di Na Cl non sono presenti le BIFOP C ed H come messo in evidenza dal saggio immunologico in Fig. 14.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 14. Western blot decorato con anti BIFOP C e anti-BIFOP H. Estratti totali (1, 4 e 7), sovrannate (2, 5 e 8) e preparati di parete (3, 6 e 9) di Ru 809/1 coltivato a diverse concentrazioni di NaCl: 1, 2 e 3, 1.75 %; 4, 5 e 6, 2.5 %; 7, 8 e 9, 3.2 %. Ogni profilo contiene 50 µg di proteine/10 µl.

La BIFOP C aumenta come quantità totale nelle cellule coltivate fino alla concentrazione dello 1.75 % di NaCl, poi si stabilizza fino alla concentrazione di 3.2 %; anche la BIFOP H aumenta come quantità totale nelle cellule coltivate fino alla concentrazione dello 1.75 % di NaCl (Fig. 13 e 15), poi diminuisce leggermente alle concentrazioni di 2.4 e 3.2 % (Fig. 14 e 16).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

BIFOP C

BIFOP H

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
0.12 %			0.2 %			0.6 %			1.0 %			1.5 %			0.12 %		

Fig. 15. Western blot decorato con anti-BIFOP C e anti-BIFOP H. Estratti totali (1, 4, 7, 10, 13, 16), sovrantante (2, 5, 8, 11, 14, 17) e preparati di parete (3, 6, 9, 12, 15, 18) di Ru 809/1 coltivato a diverse concentrazioni di NaCl: 1, 2 e 3, 0.12 %; 4, 5 e 6, 0.2 %; 7, 8 e 9, 0.6 %; 10, 11 e 12, 1.0%; 13, 14 e 15, 1.5 %; 16, 17 e 18, 0.12 %. Ogni profilo contiene 10 mg di proteine/5 ml.

1 2 3 4

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 16. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie. Preparati parietali di Ru 809/1 coltivato a diverse concentrazioni di NaCl: 1, 0.6 %; 2, 1.75 %; 3, 3.2 %; 4, 0.12 % (TPY normale). Ogni profilo contiene 50 mg di proteine/10 ml.

7.2.3 Effetto NaCl sull'idrofobicità

L'idrofobicità valutata mediante SAT test aumenta con l'aumentare della concentrazione di NaCl quindi non è certamente in rapporto con le proteine di parete che invece scompaiono dalla parete all'aumentare della concentrazione di NaCl (Tabella 7).

	ammonio NH ₄ SO ₄ %						
	0.75	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
NaCl %							
0.12	-	-	-	-	-	+	+
1.2	-	-	-	+	+	+	+
0.4	-	-	+	+	+	+	+
0.6	-	-	+	+	+	+	+
0.8	-	-	+	+	+	+	+
1.0	-	+	+	+	+	+	+
1.25	-	+	+	+	+	+	+
1.5	autoagglutina						
1.75	autoagglutina						

Tabella 7. SAT test del ceppo Ru 809/1 coltivato a diverse concentrazioni di NaCl.

7.3 Coltura in TPY diluito

Le cellule sono state coltivate in TPY diluito 1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 6:10. Da questa prova sono emersi interessanti risultati: infatti la quantità di proteina BIFOP C nell'estratto totale non viene modificata dalla diluizione del TPY rispetto al TPY normale. La BIFOP C in parete invece non viene modificata alle diluizioni minori cioè 4:10 e 6:10 mentre nelle diluizioni 3:10 e 4:10 si osserva una quantità di proteina BIFOP C in parete molto abbondante. Nella maggiore diluizione (1:10) si osserva una situazione intermedia con una quantità di BIFOP C in parete minore rispetto alle diluizioni 3:10 e 4:10, ma maggiore rispetto al controllo.

7.4 Coltura in Desferal

Saggi condotti in *B. bifidum* hanno dimostrato che il ferro è necessario per la sua crescita (Bezkorovainy et al. 1983). Nello studio quindi del rapporto fra fattori di crescita limitanti e espressione di proteine di parete è stato utilizzato il composto desferrioxamine mesylate (Desferal, ciba-geigy) che agendo come chelante del ferro, determina una carenza di ferro del substrato.

Il desferal è un composto chelante il ferro. Un substrato contenente Desferal è quindi carente di ferro e può essere utilizzato per saggi di Fe starvation. Alle concentrazioni di 20-21.5 microM rallenta lo sviluppo mentre a 23 microM è già inibente.

La crescita di RU 809/1 non è influenzata da Desferal anche alle concentrazioni che dovrebbero essere inibenti quindi il ferro non è un fattore limitante per questo ceppo. Non essendo influenzata la crescita anche le proteine di parete come è prevedibile non presentano differenze rispetto al controllo.

Le differenze di espressioni delle proteine in relazione ai diversi fattori ambientali riscontrabili in vitro possono essere presenti anche in vivo rivestendo così un importante ruolo nel successo o meno del microrganismo di sopravvivere e colonizzare un habitat.

7.5 Coltura in diversi zuccheri.

7.5.1 Effetto della coltura in diversi zuccheri sull'espressione delle BIFIOP C e H.

Le cellule di Ru 809/1 sono state coltivate in TPY addizionato di diversi zuccheri (fruttosio, galattosio, glucosio, lattosio, maltosio, melibiosio, raffiniosio, ribosio, saccarosio e xilosio) all'1.5 %. L'inoculo iniziale (10 %) derivava da una coltura già nello zucchero corrispondente. La coltura nei diversi zuccheri è stata ripetuta per 3 volte.

E' stata considerata la variabilità nell'espressione delle due BIFOP C e H di Ru 809/1 coltivato nei diversi zuccheri. La quantità di BIFOP C varia considerevolmente a seconda del tipo di zucchero. La BIFOP C è presente in maggior quantità (considerata come il 100 %) nelle cellule cresciute in raffiniosio e glucosio e in quantità decrescenti in lattosio e saccarosio (75 % rispetto a raffiniosio e glucosio),

ribosio (45 %), maltosio e melibiosio (35 %), fruttosio e xilosio (30 %), mannosio e galattosio (25 %). Alcuni confronti immunologici sono evidenziati in Fig. 17 e 18.

1 2 3 4 5 6 7 8

BIFOP C

Fig. 17. Western blot decorato con antiisero anti-BIFOP C. Preparati di parete di RU 809/1 coltivato allo 1.5 % dei diversi zuccheri: 1, galattosio; 2, mannosio; 3, preparato diluito al 50 % di saccarosio; 4, maltosio; 5, ribosio; 6, saccarosio; 7, lattosio; 8, glucosio. Quantità di proteine per ogni lane: 13.5 µg/5µl.

1 2 3 4 5 6 7

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 18. Western blot decorato con antisiero anti-BIFOP C e anti -IFOP H . Preparati di parete di RU 809/1 coltivato in diversi zuccheri all' 1.5 %: 1, maltosio ; 2, raffinotio; 3, lattosio; 4, saccarosio; 5, galattosio; 6, ribosio; 7 mannosio. Quantità di proteine per ogni lane: 50 µg/10 µl.

La quantità di BIFOP H in parete è abbastanza simile nelle cellule coltivate in presenza dei diversi zuccheri. La minor quantità è presente nelle cellule coltivate in mannosio e poco di più in quelle coltivate in galattosio.

Alcuni confronti sono evidenziati nel saggio immunologico in Fig. 19.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

A

B

Fig. 19. Western blot decorato con antiisero anti-BIFOP C. RU 809/1 : 1, 3, 5, 7, 9, 11 preparati da sovrinatante; 2, 4, 6, 8, 10, 12, preparati da pareti cellulari. Coltura in: 1 e 2, glucosio (1.5 %); 3 e 4, xilosio (1.5 %); 5 e 6, fruttosio (1.5 %); 7 e 8, melibiosio (1.5 %); 9 e 10, raffiniosio (1.5 %); 11 e 12, raffiniosio (4.6%). Quantità di proteine per ogni lane: 10 µg/5µl.

La quantità di BIFOP C ed H negli estratti totali è molto simile: infatti come evidenziato dal paragone delle diluizioni di estratti cellulari di cellule cresciute in raffiniosio e saccarosio, dove le BIFOP C e H sono maggiormente espresse, blottati e

decorati con anti BIFOP C ed H le quantità alle diverse diluizioni sono molto simili con valori leggermente maggiori per il saccarosio rispetto al glucosio: attribuendo al saccarosio il valore del 100 %, per il glucosio si ha il 95 % come valutato al viscosensitometro (Fig. 20).

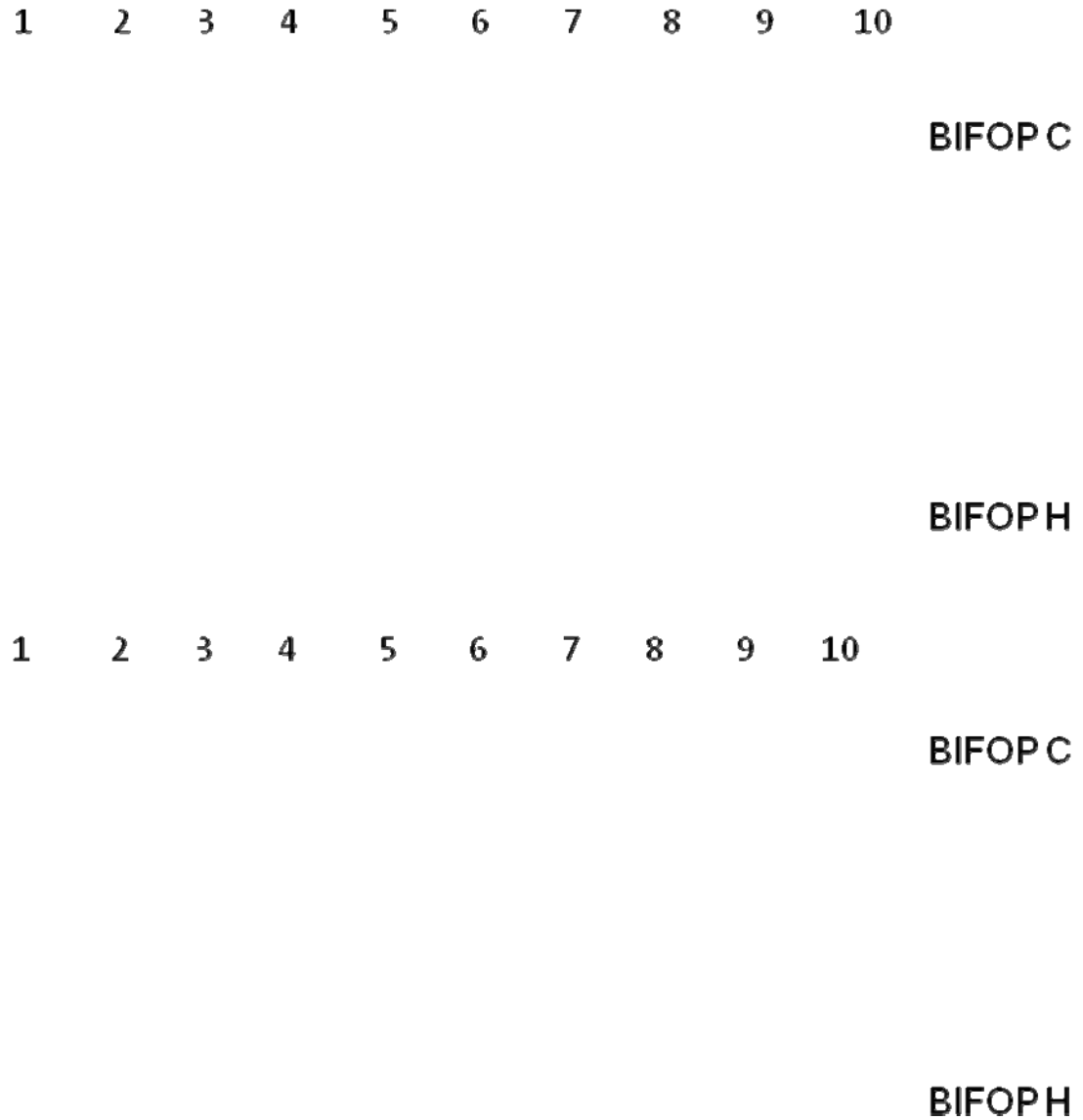


Fig. 20. Western blot decorato con anti-BIFOP C e anti-BIFOP H. Preparati parietali da cellule di RU 809/1 coltivate in raffinose (sezione A) e saccarosio (sezione B) all'1.5%: diluizioni da 1, 100%, 2, 75%; 3, 50%; 4, 25%, 5, 15%; 6, 10%; 7, 7.5%; 8, 5.0%; 9, 1.0%. Quantità di proteine per ogni profilo: 10 mg/5ml.

Nell'elettroforesi dell'estratto totale delle cellule cresciute in ribosio è presente una nuova proteina (Fig. 21) mentre nell'elettroforesi dei preparati di parete delle cellule cresciute in galattosio sono presenti due nuove proteine (Fig. 22 e 23).

1 2 3 4 5 6 7

Fig. 21. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie di estratti proteici totali di Ru 809/1 coltivato in diversi zuccheri all'1.5 %. 1, maltosio; 2, raffinotio; 3, lattosio; 4, saccarosio; 5, galattosio; 6, ribosio; 7, mannosio. Quantità di proteine per ogni profilo: 50 µg/5µl.

1 2 3 4 5 6 7

Fig. 22. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie di preparati di parete di Ru 809/1 coltivato in diversi zuccheri all'1.5 %. 1, maltosio; 2, raffiniosio; 3, lattosio; 4, saccarosio; 5, galattosio; 6, ribosio; 7, mannosio. Quantità di proteine per ogni profilo: 50 mg/10 ml.

1 2 3 4

Fig. 23. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie. 1 e 2, estratti totali e preparati parietali di RU 809/1 coltivato in galattosio 1.5%. 3 e 4, estratti totali e preparati parietali di RU 809/1 coltivato in ribosio 1.5%. ●, nuove proteine.

La variazione quantitativa delle BIFOP C ed H è stata messa in evidenza già dalla prima coltura e confermata nel secondo e terzo trapianto: la modifica quindi del substrato sembra avere un effetto immediato sull'espressione

Dato che il raffinoso ha un effetto positivo nell'espressione della BIFOP C, le cellule del ceppo RU 809/1 sono state coltivate in una concentrazione di 4.5 % di raffinoso: le cellule cresciute in raffinoso presentano un'elevata quantità di BIFOP C.

7.5.2 Effetto coltura in diversi zuccheri sull'idrofobicità

Il SAT test condotto per valutare l'idrofobicità delle cellule di Ru 809/1 coltivato nei diversi zuccheri ha rivelato che non esiste correlazione fra quantità di proteine parietali e idrofobicità: infatti le cellule coltivate negli zuccheri che determinano la maggiore espressione di proteine parietali, contrariamente a quanto prevedibile, non sono le più idrofobiche.

Le cellule maggiormente idrofobiche sono quelle coltivate in saccarosio, xilosio, fruttosio, maltosio e mannosio oltre al raffinoso che è quello che determina in RU 809/1 la maggior produzione di proteine parietali, sono state coltivate anche le cellule di RU 809/8 . Tale ceppo come detto in precedenza è un clone curato di RU 809/1 che rispetto al ceppo selvaggio ha perso il plasmide.. Tale clone oltre ad essere plasmide negativo non presenta alcuna proteina parietale mediante PAGE colorata con Coomassie. Il fatto che l'idrofobicità sia elevata anche nelle cellule di Ru 809/8 coltivate in saccarosio e mannosio , come era stato messo in evidenza in RU 809/1, è una conferma che l'idrofobicità non è determinata dalle proteine parietali ma da altri fattori.

7.5.2 Effetto tripsina sulle cellule maggiormente idrofobiche coltivate nei diversi zuccheri

E' stata inoltre valutata la sensibilità alla tripsina delle cellule che mostrano maggiore idrofobicità. Il trattamento con tripsina sembra non aver effetto sull'idrofobicità. La riduzione dell'idrofobicità sembra piuttosto legata all'esposizione a 37 °C cui si sottopongono le cellule nel saggio con tripsina. Le cellule infatti mantenute a 37° C per 30 min senza tripsina diminuiscono drasticamente la loro idrofobicità. Le cellule coltivate in mannosio mantengono un'elevata idrofobicità anche dopo il trattamento sia a 37°C, sia a 37°C con tripsina.

L'elettroforesi dei preparati parietali delle cellule trattate con tripsina mostra la netta riduzione di quantità della BIFOP C e la totale scomparsa della BIFOP H nelle cellule trattate con tripsina, mentre le proteine parietali delle cellule non trattate sono uguali a quelle delle cellule mantenute a 37° C per 30 min ma non trattate con tripsina (Fig. 24).

1 2 3

Fig. 24. Western blot decorato con anti-BIFOP C e anti-BIFOP H. Preparati parietali da cellule dei RU 809/1 coltivate in glucosio allo 1.5%: 1, cellule non trattate; 2, cellule esposte a 37°C per 30 min.; 3, cellule esposte a 37°C per 30 min. in presenza di tripsina.

7.6 Coltura a diverse concentrazioni di glucosio

Il ceppo Ru 809/1 è stato coltivato in diverse concentrazioni di glucosio (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.25, 1.5, 3.6, 5.4, 7.2, 9.0, 10.8, 12.6, 16.2, 18.0 e 36.0 %). Alla concentrazione del 36 % Ru 809/1 non sviluppa. La BIFOP C non è influenzata dalle diverse concentrazioni di glucosio mantenendosi presente in quantità più elevate nel sovrannate ma in quantità abbondante anche nei preparati di parete a tutte le concentrazioni di glucosio saggiate. La BIFOP H invece varia considerevolmente come quantità presente nel sovrannate e nei preparati di parete alle diverse concentrazioni di glucosio: a 0.1 e 0.2 % di glucosio si osserva una percentuale del 100 % nei preparati di parete e del 30 e 10 %, rispettivamente, nel sovrannate (Fig. 25).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 25. Western blot decorato con anti-BiFOP C e anti-BIFOP H . 1 e 3, preparati da sovrannate; 2 e 4, preparati da pareti cellulari. RU 809/1 coltivato in : 1 e 2, 0.1 % di glucosio; 3 e 4, 0.2 % di glucosio; 5 e 6, 0.4 % di glucosio; 7 e 8, 0.6 % di glucosio; 9 e 10, 0.8 % di glucosio; 11 e 12, 1.0 % di glucosio; 13 e 14, 1.25 % di glucosio; 15 e 16, 1.5 % di glucosio. Quantità di proteine per ogni profilo: 10 mg/5ml.

Questo rapporto è invertito nelle concentrazioni da 0.4 a 1.5 % di glucosio con quantità di BIFOP H maggiori nel sovrannate rispetto ai preparati di parete con valori del 100 % nel sovrannate e del 10-20 % nei preparati di parete dalle concentrazioni di 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 e 1.25 % di glucosio e del 40 % a 1.5 % di glucosio. Dalle concentrazioni di 3.6 a 18 % di glucosio si mette in evidenza di nuovo il rapporto quantitativo della BIFOP H presente alle concentrazioni di 0.1, 0.2

% di glucosio con concentrazioni maggiori di BIFOP H nei preparati di parete rispetto al sovranante (Fig. 26).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 26. Western blot decorato con anti BiFOP C e anti-BIFOP H. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15, preparati da sovrantante; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16, preparati da pareti cellulari. RU 809/1 coltivato in : 1 e 2, 3.6 % di glucosio; 2 e 3, 5.4 % di glucosio; 5 e 6, 7.2 %; 7 e 8, 9.0 % di glucosio; 9 e 10, 10.8 % di glucosio; 11 e 12, 12.6 % di glucosio; 13 e 14, 16.2 % di glucosio; 15 e 16, 18.0 % di glucosio. Quantità di proteine per ogni profilo: 10 µg/5µl.

La somma della quantità di BIFOP H presente nel sovranante e nei preparati di parete decresce all'aumento delle concentrazioni di glucosio da 3.6 % al 18 % (Fig. 27).

1 2 3 4

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 27. Western blot decorato con anti BiFOP C (sezione A) e anti-BIFOP H (sezione B). 1,e 3, preparati da sovranatante; 2 e 4, preparati da pareti cellulari. RU 809/1 coltivato in : 1 e 2, 3.6 % di glucosio; 3 e 4, 18 % di glucosio. Quantità di proteine per ogni profilo: 10 µg/5µl.

Anche nel saggio di PAGE colorato con Coomassie si osserva una diminuzione di proteine di parete dal ceppo RU 809/1 coltivato a 3.6 % rispetto al 18 % di glucosio (Fig. 28).

1 2

Fig. 28. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie. Preparati parietali di Ru 809/1 coltivato in 1, 3.6 % di glucosio; 2, coltivato in 18 % di glucosio.

7.8 Coltura alle condizioni ambientali che inducono la maggior espressione quantitativa di BIFOP C e H (prova MWP, Maximum Weight Protein)

7.8.1 Effetto della somma delle condizioni ambientali che inducono overespressione delle BIFOP C e H sull'espressione delle BIFOP C e H.

Dai risultati delle prove precedenti si deduce che i fattori ambientali “singoli” che hanno indotto la massima quantità di proteine parietali (BIFOP C e H) sono stati: 1)

tsar diluito 100 ml (TPY normale – Tryptone, Phytone e Yeast Extract - + 350 ml H₂O – gli altri componenti uguali -; 2) temperatura a 40° C (questo dato è stato suggerito da Mattarelli et al., 1999 e confermato dalla ripetizione dell’esperimento in cui è stata messa in evidenza la maggiore espressione di BIFOP H se i ceppi sono coltivati a 40 °C rispetto alle temperature di 37° C e 43 e 45° C (Fig. 29); 3) pH costante a 5.7-5.8 rispetto ai pH costanti a 7.5, 6.5 e 4.5; 4) raffiniosio alla concentrazione dell’1.5 %. E’ stata pertanto allestita una prova coltivando i ceppi Ru 809/1 e Ru 809/8 unendo i singoli fattori ambientali in una unica prova MWP di coltura.

1 2 3 4

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 29. PAGE (13 % gradiente) colorata con Coomassie. Preparati parietali di Ru 809/1 coltivato alle diverse temperature 1, 30° C; 2, 40 ° C; 3, 45 ° C; 4, 37 ° C.

Come messo in evidenza in Fig. 30 alle condizioni della prova MWP, le BIFOP C e H sono “sopraesprese” in Ru 809/1 mentre in Ru 809/8, che non ha proteine BIFOP C e H anche in condizioni di coltura in condizioni “normali”, non si assiste a variazioni. La BIFOP B, presente nella parete di Ru 809/8 che ha un peso molecolare

maggiore della BIFOP C ma che reagisce con lo stesso antisiero della BIFOP C, e che nel saggio al Coomassie non si mette neanche in evidenza.

1 2 3 4 5 6

BIFOP C

BIFOP H

Fig. 30. Western blot decorato con anti-BIFOP C e anti-BIFOP H. Prova MWP. 1, 2 e 3, preparati da estratto totale, sovranatante e preparati di parete di Ru 809/1, rispettivamente; 4, 5 e 6, preparati da estratto totale, sovranatante e preparati di parete di Ru 809/8, rispettivamente.

La Fig. 31 mette in evidenza l'influenza dei singoli fattori ambientali, delle condizioni standard e delle condizioni MWP sull'espressione delle BIFOP C e H. La maggiore espressione delle BIFOP C e H è ben visibile alle condizioni della prova MWP rivelando che l'effetto dei singoli fattori si somma per conferire la maggior espressione quantitativa di queste BIFOP rispetto a tutte le altre condizioni di coltura.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

BIFOP C

BIFOP H

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
TPY diluito			40° C			MWP			pH costante 5.7-5.8			raffinosisio 1 %			condizioni standard (glucosio 1.5 %)		

Fig. 31. Western blot decorato con anti BiFOP C e anti-BIFOP H. Ru 809/1 coltivato alle diverse condizioni colturali descritte nella parte bassa della figura. 1, 4, 7, 10, 13 e 16, estratti totali; 2, 5, 8, 11, 14 e 17, sovranatanti; 3, 6, 9, 12, 15 e 18, preparati di parete.

7.8.2 Prove di idrofobicità MWP

Il saggio SAT test condotto con le cellule di Ru 809/1 e Ru 809/8 coltivati nella prova MPW ha ancora una volta dimostrato l'assenza di correlzion fra idrofobicità e presenza di proteine parietali. I valori di idrofobicità sono infatti più elevati per le cellule di Ru 809/8 che non presenta espressione elevata di proteine parietali e sono invece bassi per REu 809/1 che esprime la massima quantità di proteine parietali in parete (Tabella 9)

	Concentrazioni molari di NH ₄ (SO) ₄						
	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
Ru 809/1	-	-	-	-	-	+	+
Ru 809/8	-	+	+	+	+	+	+

Tabella 9. SAT test dei ceppi Ru 809/1 e Ru 809/8 cresciuti nella prova MWP.

7.9 Effetto condizioni colturali su mantenimento plasmide

Gli effetti delle differenti condizioni colturali sulla quantità delle proteine parietali potrebbero essere dovuti alla perdita del plasmide. Il ceppo RU 809/8, infatti, che è un clone del ceppo RU 809/1 che è stato curato dal plasmide ed è pertanto plasmide negativo non possiede proteine parietali visibili al Coomassie. La coltura del ceppo Ru 809/1 a diverse concentrazioni di glucosio (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 e 1.5%) ha rivelato che il plasmide è assente alla concentrazione di 0.1 e appena visibile alla concentrazione dello 0.2% mentre è ben visibile a tutte le altre concentrazioni.

Sono state saggiate anche alte condizioni colturali per valutare l'influenza sul plasmide. La coltura a pH costante di 5.5, 6.0 e 7.5 e in presenza di desferal non ha rivelato influenza sul plasmide che è presente in tutte le cellule sottoposte alle varie condizioni colturali.

7.10 Effetto concentrazione dello 0.15 % di diversi zuccheri sul mantenimento del plasmide.

Il ceppo RU 809/1 viene coltivato in presenza dello 0.15 % di diversi zuccheri poiché è stato rivelato che RU 809/1 cresciuto allo 0.1 % di glucosio perde il plasmide. Sono stati saggiati i seguenti zuccheri: amido, arabinosio, fruttosio, galattosio, glucosio, lattosio, maltosio, mannosio, melibiosio, raffiniosio, ribosio, saccarosio, xilosio allo 0.15% utilizzando come controllo positivo il ceppo cresciuto allo 1% di glucosio.

7.11 CONCLUSIONI

In generale la crescita in condizioni ambientali limitanti determina la repressione o aumenta la sintesi di proteine di membrana o di parete (Dones et al., 1992). Tali proteine sono spesso coinvolte in fenomeni di adesione e colonizzazione che sono fattori con un importante ruolo nella relazione microrganismo-ospite.

In precedenti studi era stata messa in evidenza la relazione fra temperatura e espressione di proteine parietali in *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* (Mattarelli et al., 1999). Altri importanti fattori di stress per i batteri intestinali sono il cambiamento di pH e l'osmolarità. Sono stati pertanto studiati numerosi fattori di stress e la loro influenza nella specie *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *globosum* sull'espressione di alcune proteine parietali del ceppo Ru 809/1 plasmide positivo. Oltre al ceppo Ru 809/1 è stato studiato il ceppo Ru 809/8 che deriva dal precedente ma, in seguito a cura, è plasmide negativo. Lo studio dell'influenza dei diversi fattori di stress sullo sviluppo e sull'espressione delle proteine parietali ha riguardato diversi pH, diverse concentrazioni di NaCl, diverse concentrazioni di zuccheri, diverse concentrazioni di glucosio, substrato diluito, presenza di sostanze chelanti il ferro. Tutti questi singoli fattori di stress inducono variazioni quantitative nelle BIFOP C ed H in diverso grado rimarcando quindi la preponderante influenza dell'ambiente sullo sviluppo e sull'espressione delle proteine parietali. È stato inoltre valutata l'influenza della coltura dei diversi zuccheri sul plasmide. È stato osservato che concentrazioni dello 0.15 % dei numerosi zuccheri saggiati inducono la perdita del plasmide agendo quindi come fattori di cura del plasmide. I dati ottenuti hanno una grande rilevanza anche per quanto riguarda il rapporto fra ambiente e bifidobatteri ornando importanti conoscenze per quanto riguarda l'impiego probiotico di tale gruppo microbico.

BIBLIOGRAFIA

- Aggett PJ, Agostoni C, Axelsson I, Edwards CA, Goulet O et al. (2003) Nondigestible carbohydrates in the diets of infants and young children: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol* 36, 329-337.
- Aissi, E.A.; Lecocq, M.; Brassart, C.; Buoquelet, S. (2001). Adhesion of some Bifidobacteria strains to human enterocyte-like cells and binding to mucosal glycoproteins *Microb. Ecol. Health Dis.* 13, 32-39.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-1920.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., Gordon, J.I., (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America* 101: 15718–15723.
- Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T (1984) The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol* 28, 975-986.
- Bernet, M-F., D. Brassart, J-R. Neeser, and A L. Servin. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, pp. 4121–4128.
- Biavati B., Mattarelli P. (2007) “The family *Bifidobacteriaceae*.” In: *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Vol. 3. (M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer, E. Stackebrandt, Eds). Springer-Verlag, New York
- Biavati, B., F. Crociani, P. Mattarelli, and V. Scardovi. (1992). Phase variations in *Bifidobacterium animalis* *Curr. Microbiol.*, 25: 51–55.
- Biavati, B., S. Franzoni, H. Ghazvinizadeh, and R. Piccaglia. (1997). *Antimicrobial and antioxidant properties of plant essential oils* In: C. Franz, Á. Máthé, and G. Buchbauer (Eds.) *Essential Oils: Basic and Applied Research*. Proceedings of 27th International Symposium on Essential Oils Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL pp. 326–331.

- Biavati, B., V. Scardovi, and W. E. C. Moore. (1982). Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 32, pp. 358–373.
- Blaut, M., Clavel, T., (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *Journal of Nutrition* 137, 751S–755S.
- Borrelli, R.C., Esposito, F., Napoitano, A., Ritieni, A., Fogliano, V., (2004). Characterization of a new potential functional ingredient: coffee silver skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1338–1343.
- Brandi G, Biavati B, Calabrese C, Granata M, Nannetti A, Mattarelli P, Di Febo G, Saccoccio G, Biasco G. (2006). Urease-positive bacteria other than *Helicobacter pylori* in human gastric juice and mucosa. *Am J Gastroenterol.* 101:1756-61.
- Collado, M.C.; Gueimonde, M.; Sanz, Y.; Salminen, S. (2006). Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *J. Food Prot.*, 69: 1675-1679.
- Collado, M.C.; Meriluoto, J.; Salminen, S. (2007). Development of new probiotics by strains combination: Is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus?. *J. Dairy Sci.* 90: 2710-2716.
- Crociani, F., A. Alessandrini, M. M. Mucci, and B. Biavati. (1994). Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 24, pp. 199–210.
- Crociani, F., and D. Matteuzzi. 1982. *Urease activity in the genus Bifidobacterium* *Ann. Microbiol. (Paris, France)*, vol. 133A, pp. 417–423.
- Cummings JH, Englyst HN (1987). Fermentation in the human large intestine and the available substrates. *Am J Clin Nutr* 45, 1243-1255.
- De Vries, W., S. J. Gerbrandy, and A. H. Stouthamer. (1967). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum* *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 136, pp. 415–425.
- Dehnert, J. 1957. Untersuchungen über die Gram positive Stuhlflora des Brustmilchkinder *Zentrabl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. Reihe* A169, pp. 66–79.

- Drasar BS, Hill MJ (1974). The metabolic activities of the gut bacteria. Human Intestinal Flora. (Drasar BS, Hill MJ,eds.), pp. 26-35. Academic Press Inc Ltd, London.
- Exterkate, F.A., B.J. Otten, H.W. Wassenberg and J.H. Veerkamp. 1971. Comparison of the phospholipid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. J. Bacteriol. 106: 824-829.
- Fallingborg J (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. Dan Med Bull 46, 183-196.
- Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. Acta Paediatr 92, 48-55.
- Favier CS, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Appl Environ Microbiol 68, 219-226.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen, and C. R. Woese. 1980. *The phylogeny of prokaryotes* Science, 209: 457–463.
- Gavini, F., A.-M. Pourcher, C. Neut, D. Monget, C. Romond, C. Oger, and D. Izard. 1991. *Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin* Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 41, pp. 548–557.
- Gavini, F., M. Van Esbroeck, J. P. Touzel, A. Fourment, and H. Goossens. 1996. Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key enzyme of the bifid-shunt in *Gardnerella vaginalis* Anaerobe, vol. 2, pp. 191–193.
- Gibson, G.R., Wang, X. (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. Journal of Applied Bacteriology 77, 412–420.
- Glick, M. C., T. Sall, F. Zilliken, and S. Mudd. 1960. Morphological changes in *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor Biochem. Biophys. Acta, 37: 361–368.
- Gniechwitz, D., Reichardt, N., Blaut, M., Steinhart, H., Bunzel, M., 2007. Dietary fiber from coffee beverage: degradation by human fecal microbiota. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 6989–6996.

- Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, Isolauri (2007). Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *E.Clin Exp Allergy*. 37:1764-72.
- Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, Isolauri E.(2007). Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 37:1764-1772
- Guarner F, Malagelada JR (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* 361, 512-519.
- Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri. (2007). Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*. 92:64-66
- Gueimonde, M.; Jalonen, L.; He, F.; Hiramatsu, M.; Salminen, S. (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res. Int.* 39(4), 467-471.
- Hatanaka, M., T. Tachiki, H. Kumagai, and T. Tochikura. 1987. *Distribution and some properties of glutamine syntetase and glutamine dehydrogenase in bifidobacteria* *Agric. Biol. Chem.*, vol. 51, pp. 251–257.
- Heerdt, B.G., Houston, M.A., Augenlicht, L.H. (1994) Potentiation by specific short chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Research* 54, 3288–3293.
- Holland, D. F. 1920. Generic index of the commoner forms of bacteria *J. Bacteriol.*, vol. 5, pp. 191–229.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 22: 283-307.
- Hopkins MJ, Macfarlane GT, Furrer E, Fite A, Macfarlane S (2005) Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses. *FEMS Microbiol Ecol* 54, 77-85.

- Husain, I., J. A. Poupard, R. F. Norris. 1972. Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum* J. Bacteriol., 111: 841–844.
- Jiang, T., Mustapha, A., Savaiano, D.A., (1996) Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*.
- Kandler, O., and E. Lauer. 1974. *Neuere Vorstellungen zur Taxonomic der Bifidobacterien* Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, Orig. Reihe A228: 29–45.
- Kandler, O., and E. Lauer. 1974. *Neuere Vorstellungen zur Taxonomic der Bifidobacterien* Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, Orig. Reihe A228, pp. 29–45.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M (2004). *The KEGG resource for deciphering the genome. Nucleic Acids Res 32, D277-D280.*
- Killer, J., J. Kopečný, J. Mrázek, V. Rada, O. Benada, I. Koppová, J. Havlík and J. Straka. 2009. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., a new *Bifidobacterium* from the bumblebee digestive tract. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* In Press.
- Kojima, M., S. Suda, S. Hotta, and A. Suganuma. 1970. Necessity of calcium for cell division in *Lactobacillus bifidus* J. Bacteriol., 104: 1010–1013.
- Lauer, E., and O. Kandler. 1976. *Mechanism of the variation of the acetate/lactate/ratio during glucose fermentation by bifidobacteria* Arch. Microbiol., vol. 110, pp. 271–277.
- Lee, D.Y., Chapkin, R.S., Lupton, J.R. (1993) Dietary fat and fiber modulate colonic cell proliferation in an interactive site-specific manner. *Nutrition and Cancer* 20, 107–118.
- Lee, Y.J.; Yu, W.K.; Heo, T.R. (2003). Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21: 340-346.

- Liepke C, Adermann K, Raida M, Magert HJ, Frossmann WG *et al.* (2002) Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur J Biochem* 269, 712-718.
- Lievin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D *et al.* (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646-652.
- Mantzourani, M., M. Fenlon and D. Beighton. 2009. Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 24: 32–37.
- Marteau, P., Cuillerier, E., Meance, S., Gerhardt, M.F., Myara, A., Bouvier, M., Bouley, C., Tondu, F., Bommelaer, G., Grimaud, J.C., (2002) *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 16, 587–593.
- Martin FJ, Dumas M, Wang Y, Legido-Quigley C, Yap IKS *et al.* (2007). A top-down systems biology view of gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80, S147-S171.
- Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 75:965-969.
- Mattarelli, P., B. Biavati, F. Crociani, V. Scardovi, and G. Prati. (1993). Bifidobacterial cell-wall proteins (BIFOP) in *Bifidobacterium globosum* *Res. Microbiol.*, vol. 144, pp. 581–590.
- Mattarelli P., B. Biavati, M. Pesenti, F. Crociani. (1999). Effect of temperature stress on cell-wall protein expression in *Bifidobacterium globosum*. *Res. Microbiol.* 150:117-127.
- Matteuzzi, D., F. Crociani, and P. Brigidi. (1983). Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* *Ann. Inst. Pasteur Microbiol. (Paris, France)*, vol. 134A, pp. 339–349.

- Matteuzzi, D., F. Crociani, G. Zani, and L. D. Trovatelli. (1971). *Bifidobacterium suis* n. sp.: A new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces *Allg. Mikrobiol.*, 11. 387–395.
- Miller D.B., O'Callaghan J.P. (2005). Depression, cytokines, and glial function. *Metabolism*. 54 (S 1):33-38.
- Mitsuoka, T. (1969). Comparative studies on bifidobacteria isolated from the alimentary tract of man and animals *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, Orig. Reihe A*210, pp. 52–64.
- Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, vol. 3, pp. 11–28.
- Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID (2005). Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 3, 431-438.
- Op den Camp, H. J. M., A. Oosterhof and J. H. Veerkamp. 1985. Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicum* *Ant. v. Leeuwenhoek*, vol. 51, pp. 303–312.
- Orla-Jensen, S. 1924. La classification des bactéries lactiques *Lait*, vol. 4, pp. 468–474.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B et al. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-521.
- Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C et al. (2005) Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 243, 141-147.
- Prévot, A. R., A. Turpin, and P. Kaiser. (1967). Evolution de la systématique des anaérobies *Les bactéries anaérobies* Dunod, Paris, France pp. 1840–1878.
- Rayment, N., Mylonaki, M., Hudspith, B., Brostoff, J., Rampton, D.S. (2002) Reduced bifidobacteria and increased *E. coli* in rectal mucosa-associated flora in active inflammatory bowel disease. *Gut* 50, A29.
- Reuter, G. (1963). Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1, Orig. Reihe A*191, pp. 486–507.

- Roediger, W.E. (1982). Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83, 424–429.
- Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, Cummings J, Franck A et al. (1998). Functional food science in gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80: S147-S171
- Sartor R. (2000). Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, editor: *Inflammatory bowel disease*. 5th ed. Philadelphia (PA), pp.153-178.
- Scardovi, V. (1986). Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472^{al}. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD vol. 2, pp. 1418–1434.
- Scardovi, V., and F. Crociani. (1974). *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: Three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 6–20.
- Scardovi, V., and G. Zani. (1974). *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large, acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 29–34.
- Scardovi, V., and L. D. Trovatelli. (1965). The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium* *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, vol. 15, pp. 19–29.
- Scardovi, V., and L. D. Trovatelli. (1965). The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, vol. 15, pp. 19–29.
- Scardovi, V., and L. D. Trovatelli. (1969). New species of bifidobacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F: A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium* *Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, Abt. 2, Reihe 123, pp. 64–88.
- Scardovi, V., F. Casalicchio, and N. Vincenzi. 1979. Multiple electrophoretic forms of transaldolase and 6-phosphogluconate dehydrogenase and their

- relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 29, pp. 312–327.
- Scardovi, V., G. Zani, and L. D. Trovatelli. (1970). Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals Arch. Mikrobiol., vol. 72, pp. 318–325.
- Scardovi, V., L. D. Trovatelli, B. Biavati, and G. Zani. (1979). *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: Four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships Int. J. Syst. Bacteriol., 29: 291–311.
- Scardovi, V., L. D. Trovatelli, F. Crociani, and B. Sgorbati. (1969). Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*; *B. globosum* sp. nov. and *B. ruminale* sp. nov. Archiv. Mikrobiol., vol. 68, pp. 278–294.
- Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B et al. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci USA 99. 14422-14427.
- Schiepers O.JG., Wichers M.C., Maes M. (2005). Cytokines and major depression. Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry 29: 201–217.
- Schiffrin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J.M., Donnet-Hughes, A. (1995) Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acidbacteria. Journal of Dairy Science 78, 491–497.
- Sgorbati, B., V. Scardovi, and D. J. LeBlanc. (1982). Plasmids in the genus *Bifidobacterium* J. Gen. Microbiol., vol. 128, pp. 2121–2131.
- Silvester KR, Englyst HN, Cummings JH (1995). Ileal recovery of starch from whole diets containing resistant starch measured in vitro and fermentation of ileal effluent. Am J Clin Nutr 62. 403-411.
- Simon GL, Ghorbag S, (1984). Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology. 84:174-193
- Simpson, P. J., C. Stanton, G.F. Fitzgerald and R.P. Ross. 2003. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. J. Bacteriol. 185. 2571–2581.

- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., Reddy, B.S., (1997) *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18, 833–841.
- Smith EA, Macfarlane GT (1996). Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effect of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 81, 288-302.
- Sozzi, T., P. Brigidi, O. Mignot, and D. Matteuzzi. (1990). *Use of dicloxacillin for the isolation and counting of bifidobacteria from dairy products* Lait, vol. 70, pp. 357–361.
- Stackebrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 47, pp. 479–491.
- Tannock GW (1999) A fresh look at the intestinal microflora. In: Probiotics, A Critical Review, Tannock GW, ed., Horizon Scientific Press, University of Otago, Dundin, New Zealand, pp. 5-17.
- Tissier, M. H. (1900). *Récherches sur la flore intestinale normale et pathologique du nourrisson* (thesis) University of Paris, Paris, France pp. 1–253.
- Trovatelli, L. D., F. Crociani, M. Pedinotti, and V. Scardovi. (1974). *Bifidobacterium pullorum* sp. nov. A new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces *Arch. Mikrobiol.*, vol. 98, pp. 187–198.
- Veerkamp, J. H., G. E. J. M. Hoelen, and H. J. M. Op den Camp. (1983). The structure of a mannitol teichoic acid from *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum* *Biochim. Biophys. Acta*, 755: 439–451.
- Vesterlund, S.; Palta, J.; Karp, M.; Ouwehand, A.C. (2005). Measurement of bacterial adhesion — *in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Methods* 60: 225-233.
- Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK *et al.* (2003). A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 299. 2074-2076.