



PROGRAMMA DI RICERCA STM  
RELAZIONE SCIENTIFICA FINALE

Proponente: Dr Gianluca Corno

Il Fruitore: Dr Gianluca Corno

Istituto di afferenza : CNR-ISE Verbania

Istituto ospitante: ETH Politecnico di Zurigo – Institute of Integrative Biology, Universitatstrasse 16 Zurigo (Svizzera)

Titolo del programma: Assessing ecological impact and potential threat for human health of the spreading of antibiotic resistances in environmental bacterial species

Il progetto di ricerca pianificato è stato svolto interamente, utilizzando le strutture del Politecnico di Zurigo presso i quali lo studio di specie batteriche potenzialmente antibioticoresistenti (ABR), in comunità batteriche artificiali estremamente semplificate costituite da 4 ceppi ambientali si è cercato di relazionare il potenziale successo di specie batteriche ABR, ed il costo dell'acquisizione dell'ABR in ambiente naturale. Si è valutata inoltre la stabilità evolutiva della ABR, al fine di valutare il rischio di spread in ambiente naturale di ABR acquisite ai farmaci di maggior utilizzo.

Gli esperimenti, eseguiti in batch cultures della durata di 6 giorni (+3 di acclimatazione dei ceppi), hanno utilizzato un substrato artificiale prodotto in modo che mimasse quelli prodotti dalle specie algali più comuni nei grandi laghi europei. Sono stati utilizzati substrati arricchiti quindi con varietà variabili di tetraciline (antibiotici di sintesi di uso comune), in un caso mimando una situazione di normale concentrazione paragonabile a quella naturale di un grande lago subalpino, in un caso mimando invece una quantità 10 volte maggiore, paragonabile a quella di impianti di depurazione di reflui ospedalieri fortemente inquinati da AB.

I 4 ceppi, afferenti a diversi gruppi batterici, e differenziati anche dal punto di vista ecologico e del successo in ambienti naturali, sono stati adattati alle condizioni di laboratorio e cresciuti sia in colture pure, sia in comunità artificiali composte da due ceppi (fino a costruire una matrice in cui ogni ceppo veniva valutato in competizione con tutti gli altri, in un tipico set up da *rock-scissors-paper experiment*) inizialmente da un uguale numero di cellule per ogni ceppo, sempre comunque con concentrazioni finali di  $5 \times 10^5$  cellule per millilitro. Abbiamo selezionato *Pseudomonas putida*, un gammaproteobatterio comune e ma raramente abbondante in acque dolci, dalla forma di un bacillo di medio piccole dimensioni e senza abilità particolari nel produrre difese contro la predazione; *Brevundimonas* sp., un alfa-proteobatterio di forma coccoide, comune e occasionalmente dominante in acqua, anch'esso incapace di evidente plasticità morfotipica, ma conosciuto per la propria ben definita abilità di comunicazione e di cooperazione con altri ceppi batterici, quindi potenzialmente vettore di ABR; *Curtobacterium floccumfaciens*, un actinobatterio raro in acqua, patogeno facoltativo di vegetali, ed in grado di sviluppare grandi aggregati di cellule anche filamentose; e un ceppo rappresentante del gruppo alfa-proteobatteri (*Limnohabitans parvus*), generalmente abbondante in acqua e conosciuto per la sua abilità nell'utilizzo di differenti substrati organici.



Questi 4 ceppi, dopo un'accurata selezione tra una dozzina di ceppi ambientali su piastre in agar arricchiti e non con diversi antibiotici di sintesi, che ci hanno permesso di identificare le tetracicline come il composto più interessante, sono stati fatti crescere per tre giorni, in assenza di antibiotici, dopodiché si è provveduto costituire le comunità composte da due ceppi (9 repliche ciascuna) e a procedere, in batch alla suddivisione in trattamenti senza, con quantità limitata e con quantità eccedente di antibiotici (trattamenti 1, 2 e 3, in tre repliche per ciascun trattamento), ottenendo un totale di 88 comunità sperimentali.

Le analisi effettuate con cadenza giornaliera durante i 9 giorni di esperimento hanno permesso di conoscere in tempo reale il numero di batteri presenti, la loro differenziazione morfologica ed il loro grado di adattamento all'ambiente attraverso analisi al microscopio ad epifluorescenza di filtri marcati in DAPI. Al tempo stesso si è provveduto a quantificare con esattezza la quantità di batteri AB resistenti in piastre a diverse concentrazioni di tetraciclina.

In entrambi i casi saranno molto interessanti i dati di distribuzione, che stiamo producendo in queste settimane, sia presso i laboratori dell'ISE che presso l'ETH di Zurigo, utilizzando la tecnica del CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition Fluorescence In Situ Hybridization, protocollo descritto da Pernthaler et al., *Appl Env Microbiol* 2002) che permette di marcare con sonde specifiche i diversi ceppi da noi utilizzati, e quindi di avere una visione più definita della comunità, aggiungendo la proporzione degli stessi sul totale.

Infine procederemo alla raccolta dei dati prodotti ed alla valutazione dei risultati, attraverso l'applicazione di matrici di similarità.

  
Firma del Proponente

.....