



Tecniche di campionamento e isolamento della microfauna boccale da *Muraena helena* (LINNAEUS, 1758).

C. Bennici^a, A. Nicosia^a, M. Salamone^c, G. Biondo^a, G.M. Armeri^a, E. Macaluso^d, S. Mazzola^b, A. Cuttitta^a,

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

b - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

c - ABIEL s.r.l., Via del Mare 3 - 91021 Campobello di Mazara (TP)

d - Università degli studi di Palermo-Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Viale delle Scienze, Ed. 16 - 90128 PALERMO (PA)

Sommario

Introduzione	3
Procedura di cattura e manipolazione di esemplari di <i>Muraena helena</i>	4
Isolamento dei ceppi batterici	5
Ringraziamenti	7
Bibliografia	8

Introduzione

Le tecniche di seguito descritte, sono state eseguite con lo scopo di ricercare nuove fonti di proteasi da batteri marini. Le proteasi sono enzimi che possono essere classificati in quattro gruppi principali in base al residuo catalitico essenziale del loro sito attivo: serino proteasi, cisteino proteasi, aspartato proteasi e metalloproteasi. Ampiamente espressa negli eucarioti, procarioti e virus. Ad oggi, variegata sono le applicazioni di enzimi proteolitici nel campo della medicina rigenerativa. Queste includono, la dissociazione dei tessuti per l'isolamento di cellule da applicare alle terapie cellulari per l'ingegneria tissutale (Mineo et al., 2009). Recentemente, oggetto di studio sempre più crescente è l'identificazione di nuove fonti di enzimi proteolitici. A tal fine sono state studiate e identificate proteasi da pesci (Castillo-Yanez FJ et al., 2005) e da batteri marini (Klomklao et al., 2006; Gerday et al., 2000). È stato infatti dimostrato che gli enzimi marini hanno proprietà uniche, tra cui: l'alta efficienza a temperature più basse e la capacità di essere inattivate con un semplice innalzamento della temperatura (Zhang et al., 2010). Inoltre, dal momento che gli enzimi di microrganismi marini sono noti per essere più stabili e attivi di quelle animali e vegetali, è sorto un grande interesse per queste fonti microbiche di enzimi (Haddar et al., 2009; Macouzet et al., 2005). La crescente richiesta di questi tipi di enzimi ha portato a clonare e produrre varie proteasi, incluse le tripsine, in sistemi di espressione eterologa (Jónsdóttir et al., 2009; Uesugi et al., 2008). Sebbene tale famiglia consista principalmente di enzimi eucariotici, è stato dimostrato che batteri del genere *Streptomyces* producono tali enzimi (Olafson et al., 1975). Anche i batteri appartenenti a *Vibrio* sono noti per la produzione di diverse proteasi e collagenasi comprese metalloproteasi (Kim et al.,). Inoltre, tre differenti proteasi, denominati VesA, VesB e VesC, strutturalmente correlate alla tripsina, sono state identificate come componenti del secretoma di *Vibrio cholerae* attraverso il meccanismo di azione di tipo II (Lawrence et al., 2011).

Batteri marini come il *Vibrio spp*, *Putrefaciens Shewanella*, e *Staphylococcus* e *Micrococcus spp* sono noti per causare infezioni delle ferite nell'uomo. Tali ferite sono a volte causate da morsi di pesci (Gadwal et al., 2014).

La murena, generalmente considerata aggressiva, è in grado di attaccare gli esseri umani e il loro morso rappresenta una potenziale causa di gravi infezioni batteriche. Per questo motivo si è deciso di effettuare studi di isolamento e caratterizzazione

della microfauna batterica della bocca delle murene, e da essa caratterizzare l'attività di proteasi di interesse scientifico.

Procedura di cattura e manipolazione di esemplari di *Muraena helena*

Nella fase di programmazione dell'esperimento abbiamo progettato un sistema di cattura degli animali che evitasse ogni tipo di contaminazione dell'apparato boccale ad opera di esche. Allo scopo, è stata realizzata una nassa in materiale plastico, dotata di una tasca porta esca non raggiungibile direttamente dai pesci.

Questo stratagemma ci ha permesso di attirare i pesci in un sistema chiuso e allo stesso tempo ha evitato la contaminazione esogena da parte della componente batterica propria delle esche utilizzate.

Le operazioni di cattura sono state effettuate nelle prime ore del mattino nell'area di mare antistante l'UOS dell'IAMC-CNR di Capo Granitola, ad una profondità di 1,5 m. Abbiamo utilizzato come esca sardine congelate, le quali sono state poste nella tasca interna della nassa. Si è scelto di operare in una giornata di mare calmo ed acqua limpida per poter seguire visivamente le operazioni di pesca e poter intervenire immediatamente dopo l'ingresso della murena. Avvenuta la cattura, la nassa è stata recuperata e la murena, è stata posta in un recipiente contenente una soluzione di acqua di mare e 2fenossietanolo (500mg/l), allo scopo di indurre una sedazione profonda dell'animale. La somministrazione di 2fenossietanolo non modifica in maniera rilevante i parametri fisiologici e biochimici del pesce. I tempi di azione del 2fenossietanolo nell'indurre uno stato di sedazione profonda alla concentrazione di 500 mg/l sono paragonabili a quelli riscontrati in pesci quali spigola e orata (90 secondi) (Filiciotto et al., 2012).

Quando l'animale perde il normale assetto di nuoto e anche i movimenti mandibolari necessari a far confluire acqua alla branchie cessano, l'effetto dell'anestetico è completo e possono cominciare le operazioni di manipolazione.

Il pesce è stato prelevato dal contenitore manualmente, indossando un paio di guanti in cotone per aumentare la presa ed evitarne lo scivolamento durante le operazioni di prelievo.

Il tampone buccale è stato effettuato tramite bastoncino sterile, attenzionando l'apparato dentale, ed immediatamente richiuso in una Falcon sterile messa in ghiaccio per il trasporto in laboratorio. Grazie alla rapidità delle operazioni di campionamento, non è stato necessario allestire un sistema di approvvigionamento di acqua alle branchie per garantire la corretta ossigenazione dell'animale.

Prima di indurre il risveglio, sono stati effettuati alcuni rilevamenti biometrici (lunghezza totale, lunghezza e larghezza della testa, peso).

Le operazioni di risveglio sono state effettuate in un recipiente contenente acqua di mare, nel quale per garantire l'adeguata presenza di ossigeno disciolto, è stata insufflata aria tramite un aeratore a batteria.

A circa 15 minuti dal risveglio, ed accertata la ripresa dell'attività respiratoria e natatoria, la murena è stata rilasciata in prossimità del punto di cattura.

Isolamento dei ceppi batterici

Il tampone di cotone sterile introdotto nella bocca della murena, è stato trasportato in laboratorio e strisciato direttamente su piastra di Agar (DIFCO) Luria Bertani (LB). Dopo 24 ore di incubazione a 30 ° C, centinaia di colonie giallo pallido trasparente e piatte, tutte molto simili fra loro sono state osservate sulla piastra. Fig.1



Figura 1: piastra a 24 ore dall'incubazione

Sono stati applicati i criteri di caratterizzazione morfologica nella scelta della colonia da isolare. La valutazione delle caratteristiche morfologiche macroscopiche delle colonie quali il colore e la forma ci hanno portato ad ipotizzare che tutte le colonie

cresciute dopo la strisciata iniziale fossero della stessa tipologia e dunque che fossero la stessa specie batterica. L'ottenimento di ceppi in coltura pura è avvenuta dopo strisci successivi di colonie singole a partire dalla piastra iniziale.

Cellule provenienti da colonie cresciute in purezza sono state sottoposte a colorazione di Gram e risultati essere Gram negativi mobili esaminati al microscopio ottico.

L'intero gene 16S è stato amplificato mediante PCR in un volume di reazione di 30 μ l contenente 1 μ l di lisato della colonia, 0,2 μ M di ciascun *primer*, 0,2 mM di dNTP e 0,75 unità di DNA Taq polimerasi (New England Biolabs).

La coppia di primers utilizzati è di seguito riportata:

27F-CM 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG,

1492R 5'-TACCTTGTTACGACTT

La PCR è stata effettuata nelle seguenti condizioni: 94 ° C per 30 sec, 30 cicli di 30 secondi a 94 ° C, 1 min a 50 ° C e 1,5 min a 68 ° C; seguita da una estensione finale a 68 ° C per 5 min.

I prodotti delle reazioni di amplificazione PCR sono state analizzate su gel 1% agarosio. L'amplicone è stato purificato mediante sistema cromatografico a base silica (Macherey-Nagel, Düren, Germania) e sottoposto a sequenziamento.

Il prodotto di PCR così purificato è stato allestito per il sequenziamento automatizzato affidato alla MACROGEN[®] in Olanda.

I risultati delle indagini molecolari e comparazione in banca dati con le sequenze dei 16S ivi presenti ci hanno permesso di assegnare al genere *Vibrio* le colonie isolate.

In seguito a caratterizzazione, sono state applicate procedure di purificazione proteica, a partire da colture liquide pure. Successivi saggio biochimici ne hanno definito le caratteristiche di attività enzimatiche (Salamone et al.,2015).

Le pratiche di manipolazione utilizzate, come specificato dall'Art.2 comma 1 lettera f del D.L. 4 Marzo 2014 n. 26 non sono disciplinate dal menzionato D.L. dato che trattasi di "pratiche non suscettibili di causare dolore, sofferenza, non suscettibili di causare dolore, sofferenza, stress o danno prolungato equivalente o superiore a quello provocato dall'inserimento di un ago secondo le buone prassi veterinarie".

Ringraziamenti

Progetto: “*Tecnologie e processi per il miglioramento della shelf-life dei prodotti del comparto agroalimentare attraverso l’uso di film edibili innovativi a base pectinica*” (PON FILM-EDIBILI, Cod. PON01_02286) - CUP: B68F12000360007

Bibliografia

- 1) Mineo D; Pileggi A, Alejandro R; Ricordi C. (2009).Point: steady progress and current challenges in clinical islet transplantation. *Diabetes Care*. 328:1563.
- 2) Castillo-Yanez FJ, Pacheco-Aguilar R, Garcia- Carreno FL, Navarrete-Del Toro ML. (2005).Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*140, 91-98.
- 3) Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson BK,Saeki H. (2006). Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 144, 47-56.
- 4) Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP,Claverie P, et al. 2000Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnology*. 18(3):103-107.
- 5) Zhang C, Kim SK. (2010). Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar Drugs*. 8(6): 1920–1934.
- 6) Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, Hmidet N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. (2009). Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour. Technol.*100:3366–3373.
- 7) Macouzet M, Simpson BK, Lee BH. (2005).Expression of a cold-adapted fish trypsin in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*. 5(9):851-857.
- 8) Jónsdóttir G, Bjarnason JB, Gudmundsdóttir A. (2004). Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod-expression, purification, and identification. *Protein Expr Purif*. 33(1):110-122.
- 9) Uesugi Y, Arima J, Usuki H, Iwabuchi M, Hatanaka T. (2008).Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities, *Biochim. Biophys. Acta* .1784, 716–726.
- 10) Olafson RW, Juášek L, Carpenter MR, Smillie LB. (1975). Amino acid sequence of *Streptomyces griseus* trypsin. Cyanogen bromide fragments and complete sequence, *Biochemistry* 14 1168–1177.
- 11) Kim JC, Cha SH, Jeong ST, Oh SK, Byun SM. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*181, 707–713.

- 12) Lawrence DA, Andrews PC, Sandkvist M. (2011). Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. J Biol Chem. May 13:286.
- 13) Gadwal S, Korotkov KV, Delarosa JR, Hol WG, Sandkvist M. (2014). Functional and Structural Characterization of *Vibrio cholerae* Extracellular Serine Protease B, VesB. J Biol Chem. 21; 289 (12):8288-98.
- 14) Filiciotto F., G. Buscaino, G. Buffa, A. Bellante, V. Maccarrone and S. Mazzola (2012) Anaesthetic Qualities of Eugenol and 2-Phenoxyethanol and Their Effect on Same Haematological Parameters in Farmed European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.), Journal of Animal and Veterinary Advances. DOI: 10.3923/2012.494.502
- 15) Salamone M, Nicosia A, Bennici C, Quatrini P, Catania V, Mazzola S, Ghersi G, Cuttitta A. (2015) Comprehensive Analysis of a *Vibrio parahaemolyticus* Strain Extracellular Serine Protease VpSP37. PLoS ONE 10(7): e0126349. doi:10.1371/journal.pone.0126349.