

Caratterizzazione di Batteri *Vibrio harveyi* irradiati con luce UV e raggi X

P. Alifano², G. Ciccarese⁴, G. Buccolieri³, V. Nassisi¹, F. Paladini¹, S. Rizzato¹, M.V. Siciliano^{1,3},
A. Talà² and S.M. Tredici²

¹ *Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione, LEAS, Dipartimento di Fisica, Università del Salento & INFN - Lecce, Via Provinciale Lecce-Monteroni, 73100 Lecce - Italia Tel. +39 0832 297495, Fax. +39 0832 297482*

² *Dipartimento Microbiologia, Di.S.Te.B.A., Università del Salento, via Provinciale Lecce-Monteroni, C.P. 193, 73100 Lecce - Italia*

³ *Dipartimento di Scienza dei Materiali, University of Salento,*

Abstract

Lo studio dei batteri sottoposti a stimolazioni dovute all'ambiente è di estremo interesse per implicazioni strutturali, meccanicistiche ed evolutive. Batteri luminescenti evoluti in determinati ambienti hanno sviluppato particolari risposte e il loro comportamento può fornire informazioni sulla funzione e sulla produzione dell'enzima luciferina. Per esaminare l'interazione con radiazione UV, in condizioni controllate di laboratorio sono stati utilizzati ceppi batterici foto-luminescenti appartenenti alla specie *Vibrio harveyi* campionati da una grotta costiera con elevato contenuto di radon che genera radiazioni ionizzanti. La sopravvivenza dei ceppi batterici è stata analizzata, alla luce e al buio, a seguito di una varietà di trattamenti genotossici tra cui esposizione alle radiazioni UV. I ceppi sono stati irradiati mediante una lampada germicida. I risultati hanno dimostrato che la maggior parte dei ceppi esibiscono un basso tasso di sopravvivenza dopo l'esposizione ai raggi UV. Tutti i ceppi dopo esposizione a luce visibile e ai raggi UV hanno mostrato una forte capacità di fotoriattivazione. Questa capacità era inaspettata, poiché questi batteri sono stati prelevati da un ambiente buio in assenza raggi UV. Questo porta ad ipotizzare che la fotoriattivazione in questi batteri potrebbe essere stata sviluppata dagli stessi per riparare le lesioni del DNA provocate anche da radiazioni diverse dall'UV (ad esempio, raggi X) e che i batteri luminescenti potrebbero usare la luce da essi emessa per effettuare la fotoriattivazione. L'elevata capacità di fotoriattivazione dei batteri è stata anche confermata dai risultati di deconvoluzione. La deconvoluzione è stata applicata agli spettri di emissione che ha evidenziato la presenza di diversi picchi. La presenza del picco nel visibile è in grado di controllare l'enzima fotoliasi.

INTRODUZIONE

È sempre più noto che numerosi abitanti del mare sono vibroni luminescenti e recentemente essi stanno sollevando molto interesse sia nelle applicazioni scientifiche che commerciali[1]. Alcune specie luminose del vibrione sono patogene e possono causare la vibriosi, una grave infezione, in organismi marini sia selvatici che evoluti. Negli ultimi anni, la vibriosi è diventata una delle più importanti malattie batteriche in organismi marini-coltivati[2-4].

Molto interessante è il fatto che la luminescenza è controllata dall'operone lux. Essa è regolata in una maniera dipendente dalla densità delle cellule, chiamata quorum sensing o autoinduzione, una risposta nell'espressione genica quando molecole segnale extracellulari, chiamati autoinduttori, raggiungono una concentrazione critica[5].

Inoltre, in questo lavoro si dimostrerà che i vibroni luminescenti hanno l'enzima fotoliasi che è destinato alla riparazione del DNA. Pertanto, una migliore comprensione del suo funzionamento potrebbe, un giorno, portare allo sviluppo di farmaci in grado di riparare i danni del DNA umano[6-7].

In questo lavoro diversi batteri luminescenti *Vibrio* sono stati isolati da un campione di acqua prelevato da un sito buio in una grotta lungo la costa ionica della Puglia, in Italia vicino alla città di Otranto, 40 ° 00'43 "N 18 ° 25'50" E, al livello del mare, Fig.1. Questi batteri isolati sono stati trasportati in laboratorio a temperatura controllata (30°C) e utilizzati per sperimentazioni.

Tutti quegli isolati sono stati piastrati su terreno solido per monitorare sia la sopravvivenza e la bioluminescenza, alla luce e al buio, a seguito di una varietà di trattamenti genotossici tra cui l'esposizione alla radiazione UV. Il monitoraggio della bioluminescenza in questi batteri offre l'opportunità di definire me-



Fig. 1: Mappa che mostra la stazione di campionamento nel Nord del Mar Ionio al largo della costa di Otranto, Lecce (Italia).

glio gli effetti delle radiazioni su un sistema biologico.

APPARATO SPERIMENTALE e RISULTATI

Apparato sperimentale

L'attività bioluminescente dei batteri è stata valutata mediante l'utilizzo di un fotomoltiplicatore (PMT) 1P28 molto sensibile, capace di registrare intensità luminose molto basse come quella emessa dai nostri campioni. Il fattore di guadagno di PMT è di 5×10^6 . L'apparato sperimentale è stato inserito all'interno di una camera termostata in condizioni quasi costanti di umidità e di temperatura. L'esperimento è stato realizzato in condizioni di buio assoluto.

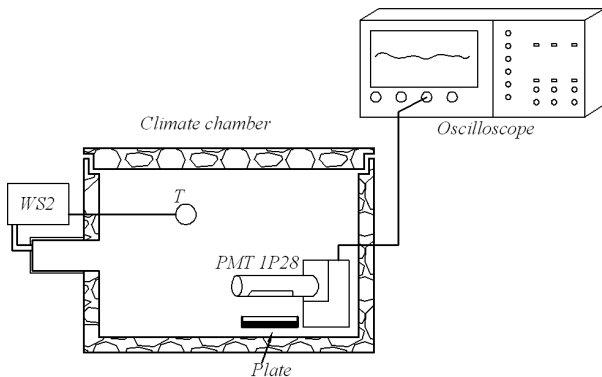


Fig. 2: Schema dell'apparato utilizzato per la misura dell'intensità totale della bioluminescenza.

Il range di sensibilità del fotomoltiplicatore è compreso tra 185 a 650 nm. La relativa finestra d'ingresso, utilizzata per prelevare la luce emessa dai campioni, è di 24 mm di altezza e 8 mm di larghezza. Il segnale del fotomoltiplicatore è letto da un oscilloscopio, Le Croy 422, che permette di visualizzarlo. Tale segnale è proporzionale alla luce emessa. Fig 2 mostra l'apparato sperimentale.

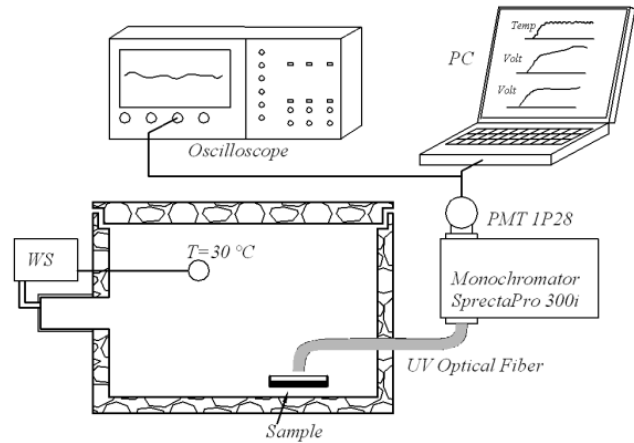


Fig. 3: Schema dell'apparato utilizzato per la costruzione degli spettri.

Per effettuare misure di lunghezza d'onda, è stato invece utilizzato un monocromatore SP-308 di lunghezza focale 0.300 m. Le piastre che contengono i campioni sono state esposte all'entrata di una fibra ottica UV che porta la luce emessa all'entrata di monocromatore. L'uscita del monocromatore è stata accoppiata ad un secondo fotomoltiplicatore 1P28. L'intensità del segnale del PMT è visualizzata dall'oscilloscopio e ad un pc per visualizzare gli spettri. La configurazione di questo apparato è indicata in Fig. 3.

Le misure sono state realizzate tramite un reticolo UV di 1200gr/mm centrato a 500 nm. Il range di funzionamento dell'apparato è da 300 a 650 nm.

Quasi tutti i segnali in uscita sono stati di bassa intensità a causa della bassa concentrazione di fotoni emessi dai campioni e raccolti dal tubo fotomoltiplicatore. Per questo motivo è stato necessario utilizzare il metodo di rilevazione denominato conteggio a singolo fotone (*single photon counting*). Dunque per stimare il valore dell'intensità è stata effettuata la sovrapposizione degli impulsi di uscita fino a 300 campionamenti ottenendo un valore continuo. La registrazione del segnale in funzione della lunghezza d'onda ha consentito di costruire gli spettri. Un segnale tipico di un oscilloscopio a singolo conteggio è mostrato in Fig. 4a, mentre il corrispondente segnale dopo 300 campionamenti è mostrato in Fig. 4b.

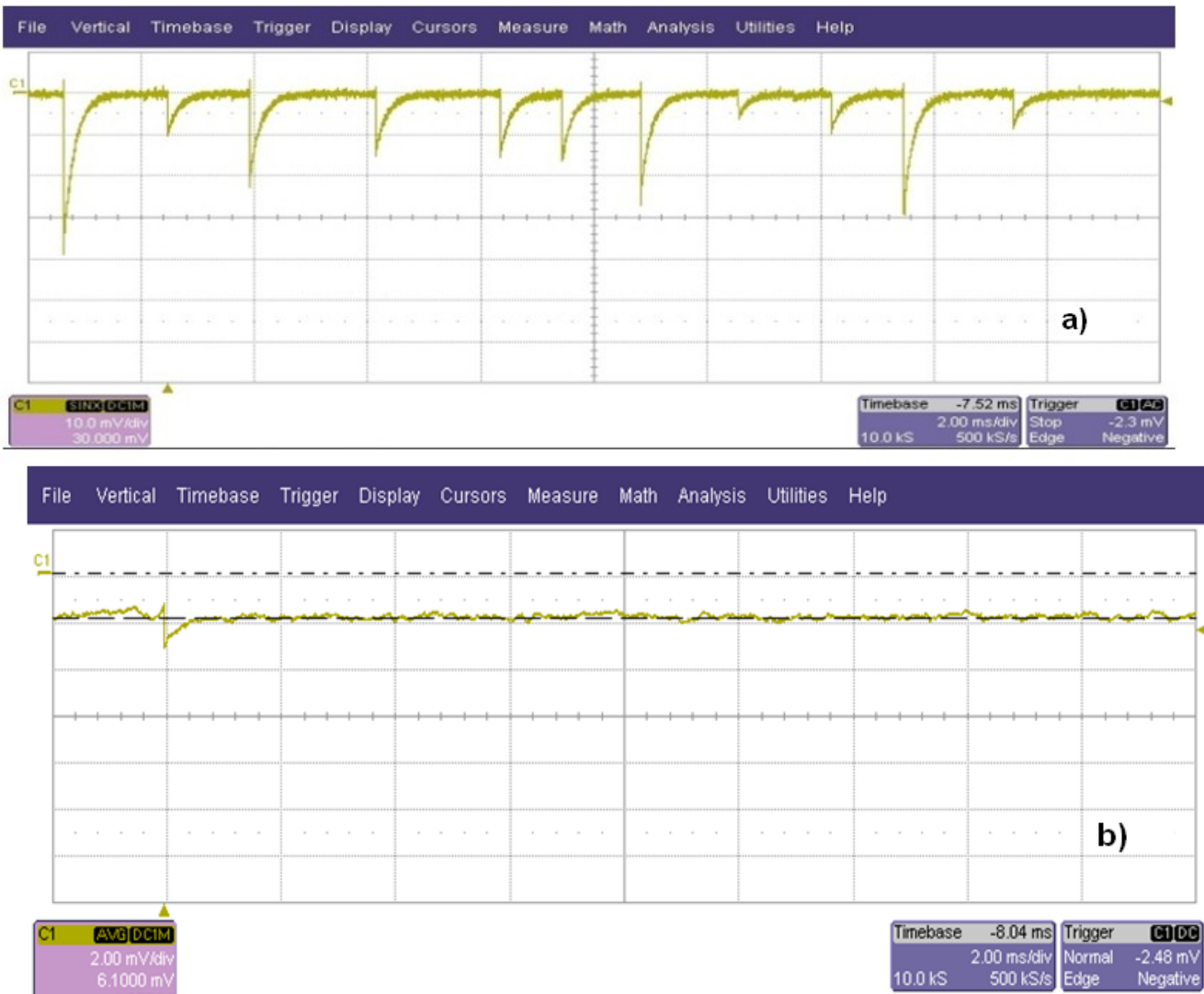


Fig. 4: Tipica forma d'onda del PMT: a) singola traccia, b) 300 tracce sovrapposte.

<i>Vibrio harveyi</i>	Total intensity (a. u.)		
	6 h	9 h	24 h
108	570	516	138
105	1035	663	256
109	1200	620	100
110	866	780	158
114	800	460	66
102	470	719	166
104	550	500	122

Tabella I: Misura di intensità totale a 6, 9 e 24 h dopo la seminazione

Misura della bioluminescenza

Sono stati isolati 12 ceppi dal campione d'acqua prelevato dalla grotta e i risultati hanno rivelato che tra tutti quelli isolati solo 7 hanno mostrato un'intensità luminosa misurabile. È stata misurata l'emissione di luce mediante l'apparato di Fig. 2, oltre all'osservazione a occhio nudo, riportando i risultati in Tabella 1. Questi mostrano le intensità della luce emessa dai nostri ceppi a 6, 9 e 24 h di crescita. Da questi risultati si può vedere che quasi tutti i ceppi isolati presentano un picco a circa 6 ore, mentre solo il ceppo 102 presenta un picco dopo 6 ore, anche se la sua massima intensità, non era molto elevata. Dalle nostre misure emerge che il ceppo 114 ha una elevata intensità all'inizio, ma diventa molto minore dopo 12 h, sottolineando dunque un'attività molto bassa alla fine della vita dei batteri. Per i suddetti motivi la nostra atten-

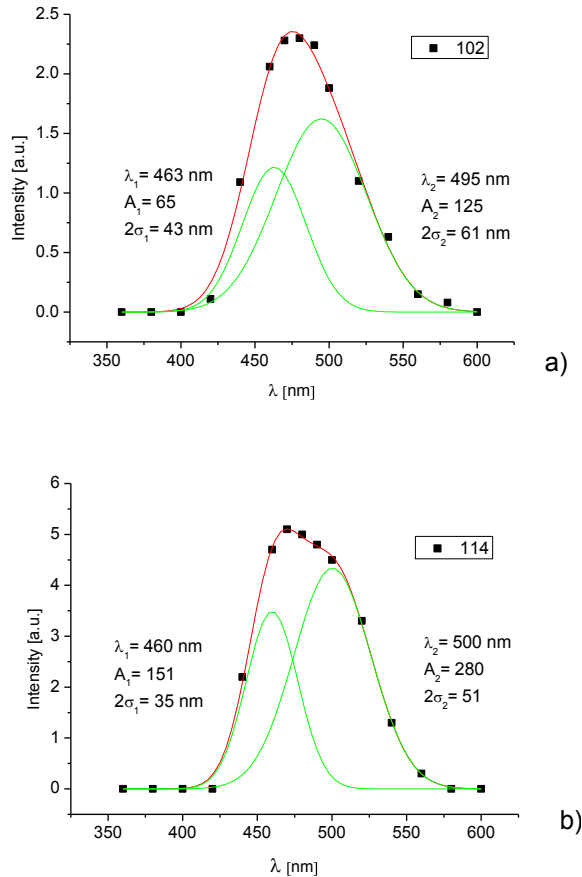


Fig. 5: Spettri di emissione e risultati del fit da due curve gaussiane di ceppi di *Vibrio* dopo 8 ore di crescita. a) campione 102 esibisce due picchi centrati a 463 e 495 nm, b) campione 114 esibisce due picchi centrati a 460 e 500 nm.

zione si è concentrata sui ceppi 102 e 114 ceppi. Gli spettri di emissione dei due campioni sono stati determinati mediante l'apparato in Fig. 3, dopo 8 h di crescita. In generale, il range di emissione considerato va da 360 a 580 nm e generalmente mostra due picchi di emissione ottenuti dal fit con due curve gaussiane. Per ottenere questo, è stato applicato il metodo della deconvoluzione. Le curve gaussiane di emissione del ceppo 102 hanno mostrato un picco a 463 e uno a 495 nm, con intensità maggiore a 495 nm. Le curve gaussiane del ceppo 114 hanno esibito, come la 102, ancora due picchi, uno a 460 e uno a 500 nm, con una maggiore intensità a 500 nm. La Fig. 5 riporta anche gli spettri ed i risultati del fit. In entrambi i ceppi la curva gaussiana presenta una superficie (intensità di emissione) più alta per la lunghezza d'onda superiore sottolineando un'attività luminosa più intensa nel campo del visibile che nell' UV, così come un'ampiezza maggiore a lunghezze d'onde maggiori.

Irraggiamento UV

Per verificare il tasso di sopravvivenza e la capacità di fotoriattivazione dopo l'esposizione ai raggi UV, è stata utilizzata una lampada germicida SpectrolineR modello ENF-260C/F UV(254) (Spectronics Corporation, Westbury, NY), avente un picco di massima efficacia in corrispondenza della lunghezza d'onda di 254 nm. L'intensità della radiazione in uscita è $420 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

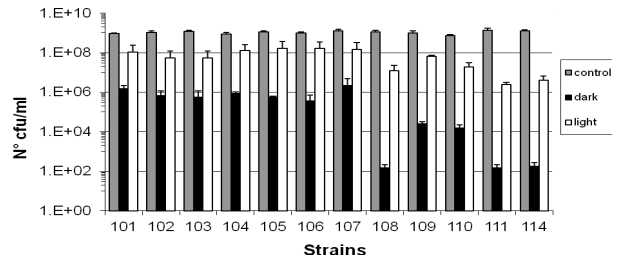


Fig. 6 Misure di sopravvivenza misure dopo UV e luce visibile: ■) concentrazione del controllo; ■) concentrazione dopo irraggiamento UV; □) concentrazione, dopo irraggiamento UV e esposizione a luce visibile.

I batteri isolati, dopo l'inoculazione, sono stati sottoposti a radiazione UV ad una distanza di 15 cm per 10 s, al buio. Dopo questo trattamento, alcuni campioni sono stati esposti a luce visibile per un tempo di 1800 s da una lampada ad incandescenza 60 W che a 30 cm di distanza offre un'intensità di $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, mentre altri sono stati tenuti al buio. Tutti i campioni sono stati incubati a 30°C per 20 ore al buio. I campioni sottoposti ai raggi UV non ha mostrato alcuna attività luminescente a causa del danneggiamento del DNA che diminuisce il fattore di sopravvivenza delle cellule da tre a sette ordini di grandezza. Fig. 6 mostra i risultati ottenuti dagli esperimenti di irraggiamento. Invece, molto diversi sono stati i risultati delle misure di sopravvivenza effettuate per i campioni esposti ai raggi UV ed in seguito alla luce visibile, Fig. 6.

In effetti, è importante osservare che tutti i ceppi hanno mostrato una forte capacità di fotoriattivazione quando piastrati in presenza di luce visibile dopo l'esposizione ai raggi UV. Questa capacità è stata abbastanza inaspettata, perché questi batteri sono stati prelevati da un sito buio in assenza di radiazione UV. Questo porta ad ipotizzare che: i.) il processo fotoriattivazione potrebbe essersi sviluppato anche per riparare le lesioni del DNA indotte da radiazioni diverse dall'UV (ad esempio, raggi X, come prodotti di decadimento del radon), ii) i batteri luminescenti potrebbero utilizzare proprio la luce da essi emessa per

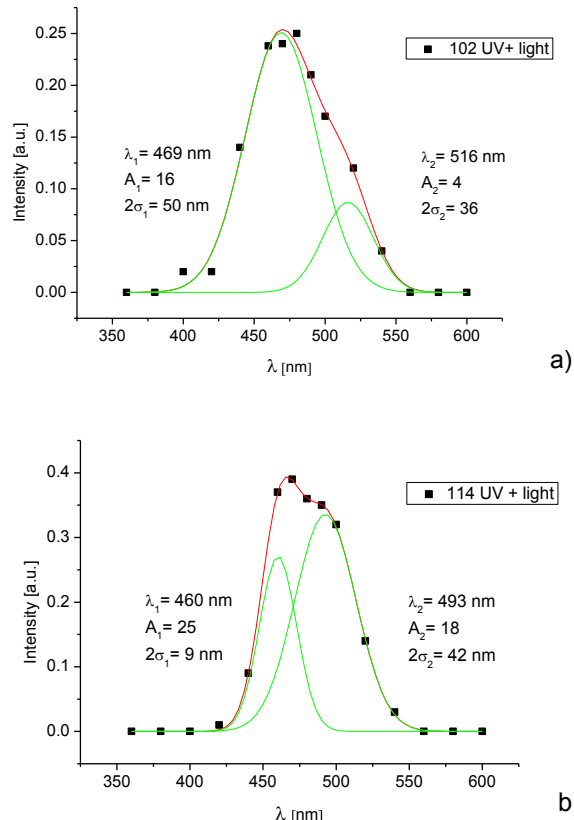


Fig. 7: Spettri di emissione dei Vibrioni, dopo irraggiamento UV e luce visibile. I punti sono i risultati sperimentali, mentre le curve gaussiane sono i risultati della deconvoluzione: a) 102 ceppo, b) 114 ceppo.

effettuare la fotoriattivazione. È stata esaminata di nuovo l'emissione di luce dei ceppi 102 e 114 dopo i trattamenti UV e visibile utilizzando l'apparato di Fig. 3. Gli spettri sono stati fittati con due curve gaussiane mediante deconvoluzione. Anche in questi casi sono stati osservati due picchi di emissione, ma diversi dai precedenti, come mostrato in Fig. 7. Al contrario dei risultati di Fig. 5, ora per il ceppo 102 si osserva un'emissione nel visibile con una minore intensità rispetto a quella corrispondente alla regione UV, mentre per il 114, l'emissione visibile ha un'intensità superiore a quella corrispondente all'UV[8]. Questa bassa emissione di luce nel visibile per il ceppo 102 può essere spiegata dai risultati di sopravvivenza. Infatti, il fattore di sopravvivenza del ceppo 102 è diminuito di 3 ordini di grandezza, contro i 7 ordini di grandezza per il 114. Quindi, possiamo ipotizzare che quest'ultimo necessita di maggiore intensità di luce visibile per operare la riattivazione rispetto al 102. Pertanto, possiamo valutare l'attività di fotoriattivazione per il ceppo 114 che è aumentata di circa 42000 volte, mentre per il ceppo 102 è di 88

volte. Inoltre, la lunghezza d'onda della luce visibile era $2\sigma_2 = 42$ nm per il ceppo 114 e $2\sigma_2 = 36$ nm per il ceppo 102 così come l'effetto di fotoriattivazione è stato più marcato per il ceppo 114 che per il 102. Pertanto, l'elevata resistenza sviluppata da questi batteri alle radiazioni UV potrebbe essere stata sviluppata a causa dell'elevato contenuto di radon nell'ambiente colonizzato dai vibrioni luminosi.

Irraggiamento X

Ulteriori misure sono state condotte con i raggi X. Allo scopo è stato utilizzato un generatore di raggi X fornito dalla OXFORD Instruments (mod. TFSerie). Esso è composto da un anodo di tungsteno (W) e una finestra di Be da 250 μ m con una tensione massima di 50 kV. La corrente del filamento può aumentare fino a 1 mA. All'interno del tubo a raggi X, un fascio di elettroni è diretto verso un punto focale per l'anodo. Appena questi elettroni colpiscono il bersaglio, disperdono la loro energia per bremsstrahlung e si generano raggi X. La corrente di filamento di riscaldamento è alimentata da un alimentatore CA con un trasformatore di isolamento. La potenza massima del trasformatore fu di 80 W. In questo esperimento, la tensione massima di accelerazione applicata è stata di 20 kV, corrente di filamento 0,10 mA e tempo di esposizione 30 min.

Abbiamo applicato l'irraggiamento X a tre ceppi, selezionati sulla base dei risultati ottenuti con l'irraggiamento UV. Questi ceppi sono stati: il 102, che ha rivelato un tasso di sopravvivenza superiore ai raggi UV, il 108 ed il 114 che erano più sensibili alle radiazioni UV.

I risultati della crescita dei campioni trattati con raggi X a diverse condizioni hanno rivelato che a dosi moderate i batteri sono in grado di sopravvivere, mentre ad alte dosi hanno mostrato una minore o nessuna sopravvivenza, Fig. 8. A conferma di ciò, da esperimenti di controllo abbiamo dimostrato che i vibrioni bioluminescenti sono molto più resistenti ai raggi X rispetto a colture di *Escherichia coli*. L'elevata resistenza di questi batteri a raggi X conferma la loro capacità di svilupparsi in ambienti di radiazione ionizzante come la grotta della Zinzulusa.

CONCLUSIONI

In questo lavoro sono stati studiati i batteri *Vibrio harveyi* foto-luminescenti, campionati da una grotta costiera con un alto contenuto di radon che emette

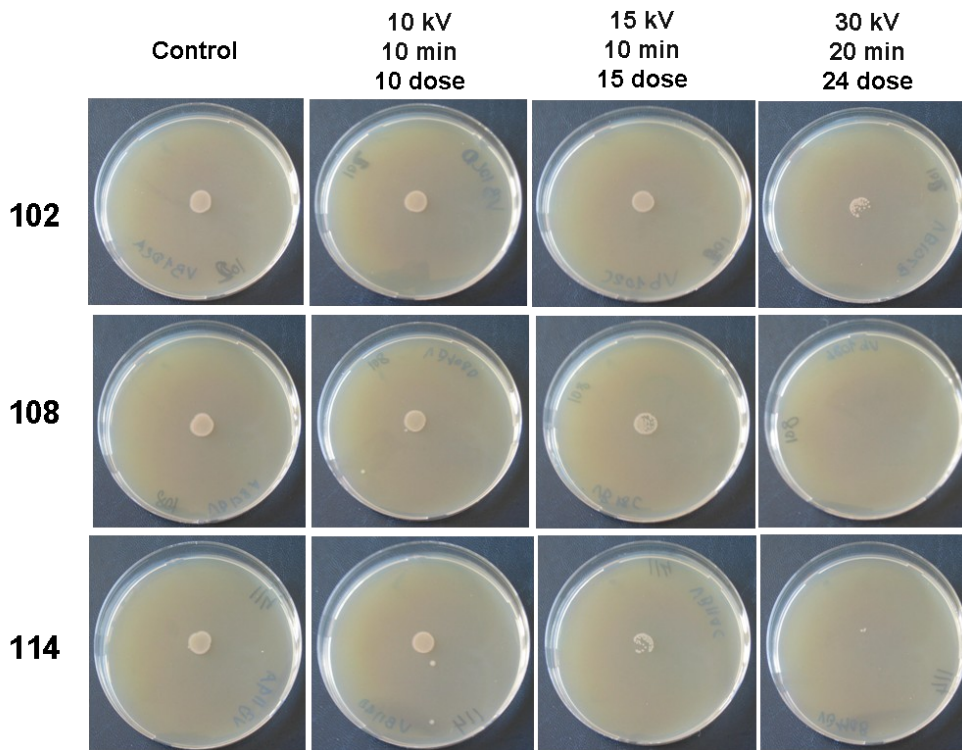


Fig. 8: Foto delle piastre dei Vibrioni, dopo irraggiamento X a varie condizioni. Le foto della terza colonna (più alta dose di X) non si evidenziano crescite.

radiazioni ionizzanti. I risultati hanno dimostrato che la maggior parte dei ceppi presentavano un basso tasso di sopravvivenza in seguito all'esposizione ai raggi UV. Agli spettri di emissione, prima dell'esposizione a radiazione UV e dopo l'esposizione UV ed irraggiamento col visibile, è stato applicato il metodo della deconvoluzione trovando due picchi di emissione. Tutti i ceppi dopo irradiazione UV e visibile hanno mostrato un'elevata capacità di fotoriattivazione. Questa capacità è stata piuttosto inaspettata, perché questi batteri sono stati prelevati da un ambiente buio in assenza di raggi UV. Questo porta ad ipotizzare che la fotoriattivazione in questi batteri potrebbe essere stata sviluppata per riparare le lesioni del DNA indotte anche da radiazioni diverse dall'UV (ad esempio, raggi X) e che i batteri luminescenti possano utilizzare la luce da essi emessa per effettuare la fotoriattivazione. Con le misurazioni di lunghezza d'onda di soli due ceppi batterici, è stato trovato che l'effetto fotoriattivazione era molto più marcato per il ceppo avente una più elevata luce nel visibile. È stata valutata la fotoriattivazione per il ceppo 114 a circa 42.000 volte, mentre per il ceppo 102 è stato solo 88 volte. Con ulteriori esperimenti di controllo abbiamo dimostrato che i vibrioni bioluminescenti sono molto più resistenti ai raggi X rispetto a colture di *Escherichia coli*. L'elevata resistenza di questi batteri a raggi X conferma la loro capacità di svilupparsi in ambienti ricchi di radiazione ionizzante come la grotta della Zinzulusa.

REFERENCES

- [1] S.H.D. Haddock, M.A Moline, J.F. Case, *Annu. Rev. Marine Sci.* **2**, 443 (2010).
- [2] T. Defoirdt, N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete, P. Bossier, *ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology* **2**, 19 (2008).
- [3] M.B. Miller, B.L. Bassler, *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 165 (2001).
- [4] A. Sancar, *Chem. Rev.* **103**(6), 2203 (2003).
- [5] C.P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (47), 1769 (2006).
- [6] J. Kozakiewicz, M. Gajewska, R. Lyzeń, A. Czyz, G., Wegrzyn, *FEMS Microbiol. Lett.* **250**(1), 105 (2005).
- [7] E.L. Walker, J.L. Bose, E.V. Stabb, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(10), 6600-6 (2006).
- [8] S. Rizzato, "Spettro di emissione a bassa intensità nei processi di bioluminescenza", Tesi di Laurea in Fisica, *Università del Salento* (2010)