

# BDELLOVIBRIO BACTERIOVORUS TO CHALLENGE *E. COLI* ON A MEAT MATRIX

Donatella Ottaviani<sup>1</sup>, Silvia Peralisi<sup>1</sup>, Gabriele Angelico<sup>1</sup>, Elena Rocchegiani<sup>1</sup>, Stefania Scuota<sup>1</sup>, Annalisa Petruzzelli<sup>1</sup>, S.Fischella<sup>1</sup>, Giuliana Blasi<sup>1</sup>, Enrico DiRaimo<sup>1</sup>, Francesca Leoni<sup>1</sup>, Mario Latini<sup>1</sup>, Serena Altissimi<sup>1</sup>, Naceur Haouet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati"

## Introduzione

*Bdellovibrio bacteriovorus* appartiene a *Bdellovibrio* and like organisms (BALOs), batteri Gram-negativi, aerobi, predatori verso altri Gram-negativi (1,6). In particolare *B. bacteriovorus* ha come preda preferita *E.coli* (2,3). *B.bacteriovorus* negli ultimi 50 anni è stato oggetto di interessanti applicazioni pratiche in medicina, agricoltura, veterinaria e per il trattamento di batteri antibioticoresistenti (1). Poiché è stato ampiamente dimostrato che *B.bacteriovorus* non può crescere in cellule eucariotiche (1), non rappresenta un rischio specifico per l'uomo. Inoltre, la sua capacità di parassitare i batteri organizzati in biofilm o nelle forme VBNC (1), rende *B.bacteriovorus* non suscettibile a quei meccanismi di competizione o difesa che i batteri patogeni ed alternativi potrebbero attivare sugli alimenti. Alla luce di queste evidenze *B.bacteriovorus* potrebbe trovare applicazione per contenere la contaminazione microbica degli alimenti, sostituendo od integrando approcci convenzionali. In questo studio abbiamo testato l'attività predatoria di *B. bacteriovorus* nei confronti di *E.coli* su fette di petto di pollo sperimentalmente contaminate con  $10^7$ PFU/ $10^5$ CFU per ml predatore/preda. Per comprendere i fattori che potessero influenzare la relazione predatore/preda sulla matrice carnea, abbiamo eseguito il test parallelamente in un microcosmo liquido nelle stesse condizioni di pH, temperatura e rapporto predatore/preda.

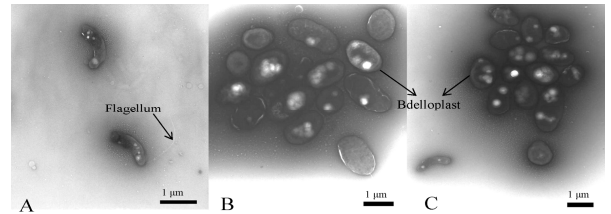


Figura 1. Microfotografia elettronica a trasmissione di un ceppo di BALOs isolato da acqua di mare nei nostri laboratori (A) libero nella fase di attacco della preda (x 13.000), (B) durante la replicazione all'interno del bdelloplasto (x 10.000), (C) durante la lisi della preda e il rilascio di progenie (x 8.000)

## Materiali e metodi

Il ceppo *E.coli* ATCC 15144 è stato usato come preda. Gli arricchimenti sono stati preparati da una coltura stock in BHI fino a quando la preda raggiungeva un OD600 di 0,800 (~  $1,8 \times 10^7$  CFU per ml). *B.bacteriovorus* 109 ATCC 15143 è stato usato come predatore. Per preparare la fase di attacco 20  $\mu$ l della coltura madre del predatore e 100  $\mu$ l dell'arricchimento della preda venivano aggiunti a 10 ml di brodo nutriente diluito (DNB) ed incubati a 30°C per 24 h. Gli arricchimenti (circa  $1 \times 10^8$  PFU per ml) venivano poi filtrati con un filtro per siringa Millex HV da 0,45  $\mu$ m per rimuovere la preda primaria. Le fettine di petto di pollo venivano tagliate in 21 pezzi dal peso di 10 grammi ognuno e posti in altrettanti vasetti di vetro e trattati in autoclave per 15 minuti a 121°C. 10 aliquote venivano assegnate al controllo ed altrettante al test. Prima dell'esperimento, nell'aliquota restante venivano misurati il pH e l'attività dell'acqua con valori che erano rispettivamente di 6,10 e di 0,99. I pezzi controllo e test venivano contaminati distribuendo su tutta la superficie da un solo lato di ogni aliquota 0,5 ml di sospensione della preda alla concentrazione di  $10^5$  UFC per ml. Dopo 15 minuti di aerazione sotto cappa a flusso laminare, le porzioni del test venivano contaminate con 0,5 ml del predatore alla concentrazione di  $10^7$  PFU per ml. Tutte le porzioni test e controllo venivano incubate a 30°C ed a 0, 1, 3, 6, 24 h dal trattamento venivano effettuate le conte del predatore e della preda. Per la preda, 10 grammi venivano diluiti 1:10 in acqua peptonata tamponata ed omogeneizzati. Dalla sospensione madre venivano effettuate diluizioni decimali in soluzione sale peptone. Quindi 1 ml di ciascuna diluizione veniva inoculato su TBX e le piastre incubate a 44°C per 24 h (4). La conta di *B.bacteriovorus* era eseguita con il saggio di placca combinando 0,1 ml di arricchimento della preda e 1 ml di omogenato di carne non diluito o diluito e le piastre incubate a 30°C per 24 h fino a 5 giorni (5, 6). In parallelo, sono stati preparati e analizzati allo stesso pH della carne, temperatura di incubazione, rapporto predatore/preda analoghi test e controllo in DNB. Ogni esperimento è stato ripetuto 3 volte ed ogni prova è stata eseguita in duplicato (n = 6). I risultati delle analisi microbiologiche sono stati riportati come valori medi (log trasformati)  $\pm$  deviazione standard ed analizzati utilizzando il test t di Student con (P)  $\leq$  95%.

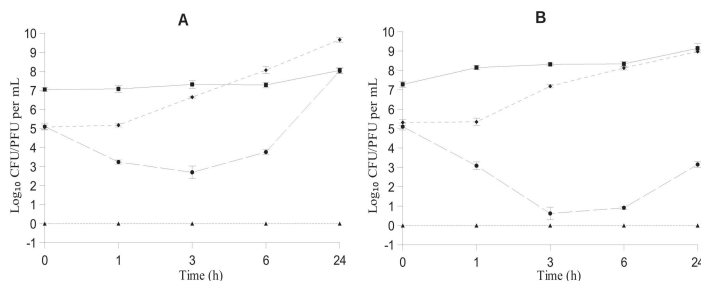


Figura 3. Dinamiche di crescita di *B.bacteriovorus* (Bb) e *E.coli* nel test (con Bb) e controllo (senza Bb) nei microcosmi petto di pollo (A) e DNB (B).  $\blacklozenge$  *E.coli* controllo;  $\blacktriangle$  *E.coli* test;  $\blacklozenge$  Bb controllo;  $\blacktriangle$  Bb test

## Risultati e discussione

Gli andamenti predatore/preda nei microcosmi test e controllo del petto di pollo e DNB sono riassunti in Figura 3. I livelli del predatore erano sempre più elevati sul test DNB che sul test petto di pollo, con la differenza massima a 24 h di 1,1 log. I livelli di *E.coli* sul petto di pollo erano sempre più bassi nel test rispetto al controllo, con la differenza massima di 4,3 log a 6 h. I livelli di *E.coli* erano sempre più bassi nel test DNB rispetto al test petto di pollo, con la differenza massima a 24 h uguale a 4,9 log. Utilizzando un rapporto predatore/preda di  $10^7$  PFU/ $10^5$  CFU per grammo, *B.bacteriovorus* è stato in grado di contenere il livello di *E.coli* con una riduzione significativa rispetto al controllo già dopo 1 ora, sia nella matrice petto di pollo che in DNB. Tuttavia la maggiore efficacia del predatore verso la preda nel mezzo liquido rispetto alla carne, nelle stesse condizioni sperimentali, dimostra come la matrice abbia influenzato negativamente le prestazioni del predatore. Una possibile spiegazione potrebbe essere la diminuzione di contenuto di acqua e/o la mancanza di film d'acqua sulla carne che renderebbe questa meno adatta del brodo per l'attività predatoria di *B.bacteriovorus*. Questa ipotesi sembra essere confermata confrontando l'andamento del predatore nei test petto di pollo e DNB, con conte sempre più basse nel primo che nel secondo. Questo è uno studio preliminare con lo scopo di valutare l'effetto matrice carne, sulla dinamica della crescita preda-predatore. Alla luce dei nostri risultati, *B. bacteriovorus* per la sua modalità predatoria, potrebbe rappresentare un candidato adatto per lo sviluppo di strategie biologiche di controllo di *E.coli* in alimenti a base di carne che abbiano una breve vita commerciale. Prossimi obiettivi saranno (a) valutare, l'efficienza predatoria di *B.bacteriovorus* verso diversi ceppi di *E.coli* inclusi gli STEC, (b) eseguire test su alimenti carnei in presenza della normale flora microbica residenziale, (c) analizzare alimenti a base di carne alle loro temperature di conservazione.

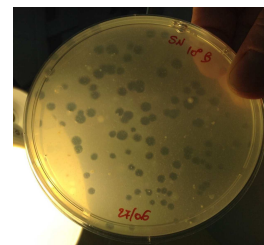


Figura 2. Piastre di lisi di *B.bacteriovorus* verso *E.coli* nella matrice petto di pollo a 24 h

QUESTO LAVORO È STATO FINANZIATO DAL MINISTERO DELLA SALUTE (RC 2017-002)

## Bibliografia

- [1] Dwidar, M., Monnappa, A.K. & Mitchell, R.J. (2012). The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Reports*, 45, 71-78.
- [2] Fratamico, P.M. & Whiting, R.C. (1995). Ability of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J to lyse Gram-negative food-borne pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 58, 160-164.
- [3] Fratamico, P.M. & Cooke, P.H. (1996). Isolation of *Bdellovibrios* that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. *Journal of Food Safety*, 16, 161-173.
- [4] ISO 16649-2: 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs— Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*— Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide. International Standards Organisation, Geneva, Switzerland.
- [5] Ottaviani, D., Chierichetti, S., Angelico, G., Forte, C., Rocchegiani, E., Manuali, E. & Leoni, F. (2018). Halobacteriovorax isolated from marine water of the Adriatic sea, Italy, as an effective predator of *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1/O139 *V. cholerae*, *V. vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology*, 4, 1199-1207.
- [6] Stolp, H. & Starr, M.P. (1963). *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. nov., a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 29, 217-248.