

Bdellovibrio and like Organisms (BALOs): un nuovo approccio per il controllo dei patogeni microbici nei molluschi?

F. Mosca¹, G. Angelico², D. Ottaviani², S. Chierichetti³, C.E. Di Francesco¹, F. Leoni², P.G. Tiscar¹

¹ Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria – Teramo (TE); ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche – Ancona (AN); ³ Biologa libero professionista

Introduzione

I BALOs (Bdellovibrio and like organisms) costituiscono un gruppo di batteri Gram negativi di piccole dimensioni, mobili, aerobi obbligati e filogeneticamente eterogenei. La peculiarità dei BALOs consiste nella capacità di penetrare in batteri Gram negativi e replicare nello spazio periplasmico con seguente lisi della cellula ospite (Fig.1). I BALOs sono presenti in maniera ubiquitaria nell'ambiente sia terrestre che marino e, in considerazione della loro attività predatoria e della mancanza di patogenicità verso organismi superiori, sono stati proposti come agenti di controllo biologico nei confronti di batteri patogeni non solo in matrici di tipo alimentare ed ambientale, ma anche nel trattamento di malattie infettive.

Il presente lavoro è stato quindi finalizzato all'isolamento di BALOs da ambienti marini e salmastri, verificandone *in vitro* l'attività predatoria nei confronti di *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp., così come successive prove *in vivo* sono state condotte al fine di valutare l'efficacia di un particolare ceppo isolato (*Halobacteriovorax*) nella riduzione di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi marini (MBM) sperimentalmente contaminati.

La depurazione costituisce un processo cruciale nella decontaminazione batterica dei MBM, tuttavia le procedure convenzionali non risultano particolarmente efficaci nei confronti di *Vibrio* e *Salmonella* [1] [2] [3]. Approcci innovativi alla depurazione post-raccolta, come Individually Quick Frozen (IQF), Heat – Cool Pasteurization (HCP) ed High Hydrostatic Pressure (HHP), spesso sono fatali per i molluschi bivalvi e non soddisfano quei consumatori che desiderano consumare molluschi crudi [4]. Pertanto il presente studio focalizza l'interesse nei confronti dei BALOs e del loro potenziale ruolo nella decontaminazione dei MBM sottoposti a depurazione, al fine di garantirne la sicurezza microbiologica, preservandone parallelamente la qualità e la shelf life.

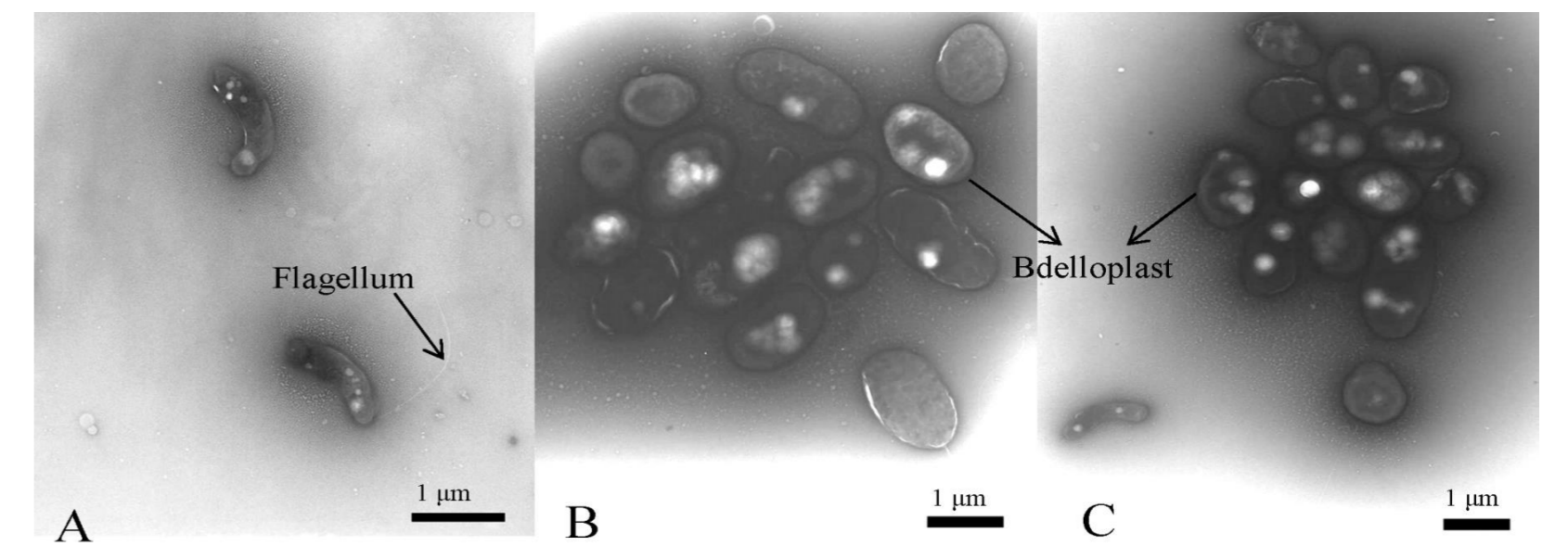


Fig.1 Foto al Microscopio elettronico a trasmissione di HBXCO1 (A) nella fase di attacco libero della preda primaria, dove si evidenziano cellule solitarie e flagellate (x13,000), (B) mentre replica all'interno del bdelloplasto (x 10,000), (C) durante la lisi della cellula ospite e il rilascio della progenie (x 8,000)

Materiali e metodi

L'isolamento di BALOs da matrici ambientali è stato condotto mediante tecnica in doppio strato di agar. I campioni di acqua sono stati centrifugati e filtrati prima di essere posti in agar insieme ai batteri preda (*V.vulnificus*, *V.alginolyticus*, Non O1/O139 *V.cholerae*, *Salmonella napolis*, *Salmonella derby*, *Salmonella typhimurium* e variante monofasica 4, [5], 12, *E.coli*, *A.hydrophila*, *P. aeruginosa*). Le piastre erano incubate a 25°C fino a 10 giorni e aloni di lisi riconducibili a BALOs sono stati selezionati in funzione della tempistica di apparizione ed evoluzione morfologica. I ceppi positivi a metodiche molecolari sono stati stoccati e sulla base della specificità, dell'intensità litica verificata nei saggi di placca e del sequenziamento molecolare, le indagini sono proseguite con due ceppi di *Halobacteriovorax*. Il primo ceppo è stato isolato da acque del litorale Adriatico della provincia di Ancona con preda primaria *V.parahaemolyticus* (Vp), ed è stato denominato HBXCO1, con sequenza molecolare registrata in Genbank (numero di accesso MG 770616). Un secondo ceppo è stato isolato da acque della foce del fiume Tordino (TE) utilizzando come preda primaria *Salmonella napolis*, ed è stato denominato M7.

La capacità dei ceppi HBXCO1 e M7 di ridurre, rispettivamente, la carica di *V. parahaemolyticus* e salmonelle (*S. napolis*, *S. derby*, *S. typhimurium* e variante), è stata indagata primariamente in sistemi *in vitro*, mediante metodica microbiologica standard.

Sulla base delle indicazioni ottenute si è proceduto ad effettuare una prova di bioaccumulo ed eliminazione di *V.parahaemolyticus* in vasca per valutare la capacità depurativa dei mitili, provenienti da un allevamento al largo della costa anconetana, utilizzando il ceppo HBXCO1 come predatore.

Sono state utilizzate 3 vasche contenenti ciascuna 40 litri di acqua di mare artificiale al 3% di salinità ad una temperatura di 17°C. Una vasca per l'acclimatazione, una per il controllo e una per il test. Prima di posizionare i mitili in vasca, un'aliquota è stata analizzata per valutare il livello naturale di Vp. Dopo una acclimatazione di 24 ore i mitili sono stati contaminati con una concentrazione di *V.parahaemolyticus* pari ad un 10⁶ ufc in vasca. Al termine di questa fase un'aliquota di mitili è stata prelevata per verificare il livello di contaminazione raggiunto, mentre la restante parte è stata suddivisa equamente nella vasca di controllo ed in quella del test contenente una concentrazione di BALOs pari ad un 10⁵ in vasca.

Per i successivi tre giorni sono state prelevate delle cozze e dell'acqua da ogni vasca per valutare l'andamento di crescita del Balos e del *V.parahaemolyticus*.

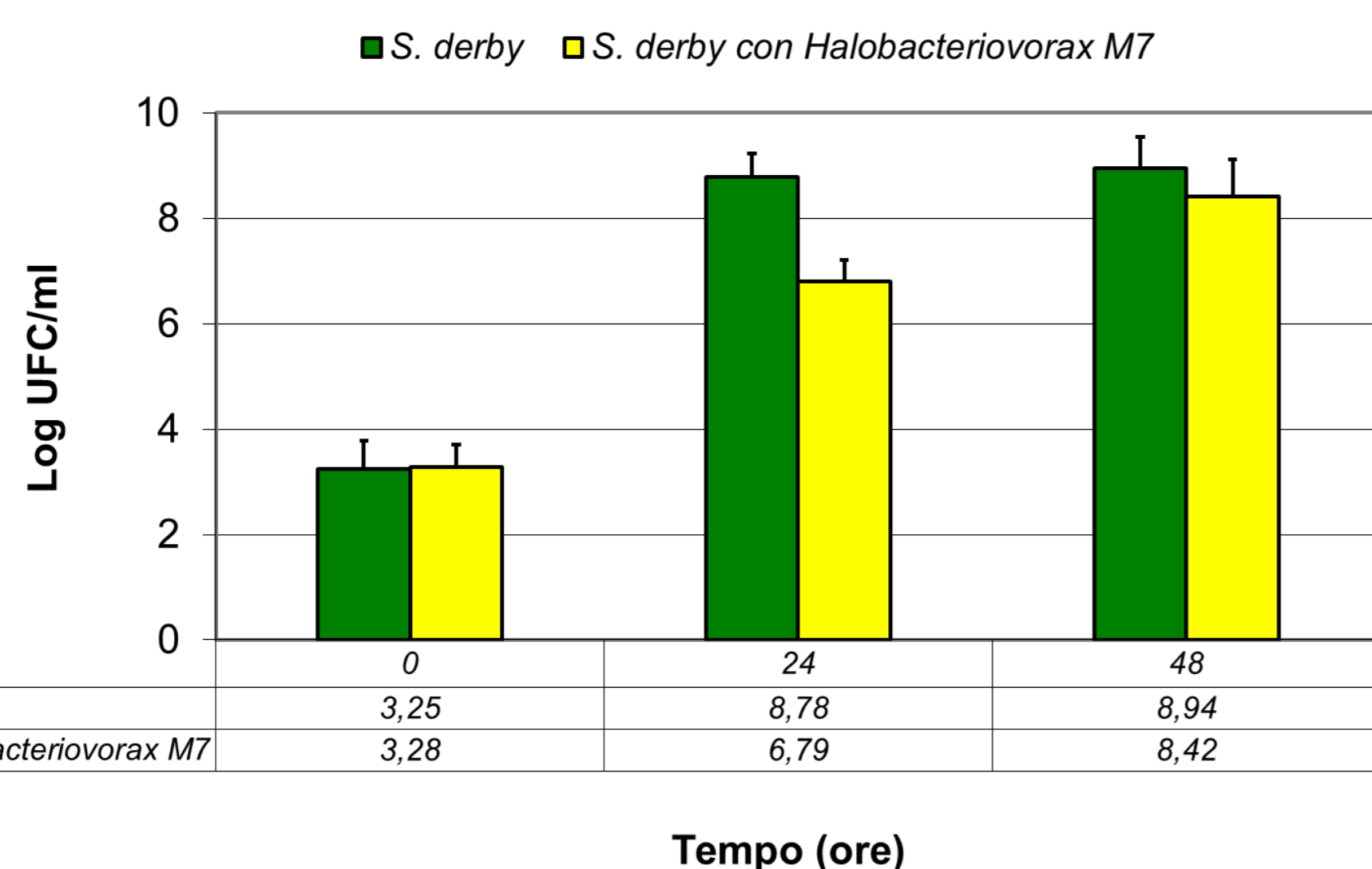


Fig.2 Valori di carica di *S. derby* durante la co-incubazione *in vitro* con *Halobacteriovorax* M7 (*p<0.01 vs crescita controllo di *S. derby*)

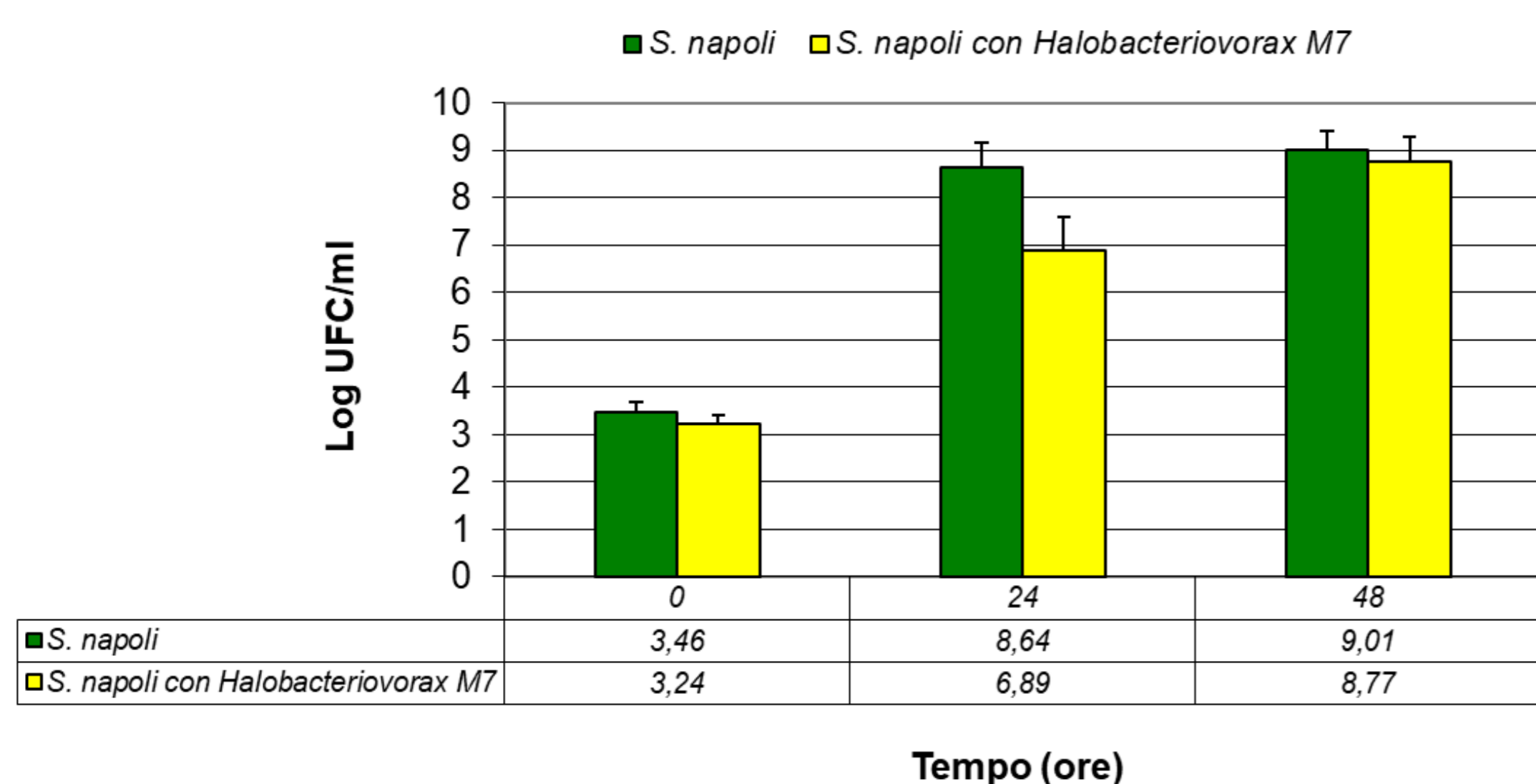


Fig.3 Valori di carica di *S. napolis* durante la co-incubazione *in vitro* con *Halobacteriovorax* M7 (*p<0.01 vs crescita controllo di *S. napolis*)

Risultati e discussione

HBXCO1 e M7 mostrano una significativa attività predatoria nei confronti delle rispettive prede, riscontrata sia attraverso l'osservazione di aloni di lisi nella metodica in doppio strato di agar, sia nelle prove *in vitro* che hanno evidenziato la capacità dei due ceppi di ridurre significativamente la carica dei batteri preda, particolarmente nelle prime 24 ore di co-incubazione (Fig.2,3,4). Inoltre, il HBXCO1 ha mostrato anche una elevata specificità d'ospite.

I risultati ottenuti nella prova *in vivo* dimostrano come il livello di Vp nella vasca test nel corso dell'esperimento diminuisca progressivamente fino a 2 Log, mantenendosi sempre ad un livello inferiore rispetto ad *Halobacteriovorax*. Il livello di *Halobacteriovorax* si mantiene più alto rispetto al livello del Vp fino a circa 72 ore dall'inoculo, poi decresce contemporaneamente all'esaurirsi del ceppo preda.

Per quanto riguarda la vasca di controllo, invece, l'andamento del *V. parahaemolyticus* rimane costante per le prime 48 ore per poi subire una lieve diminuzione alle 72 ore.

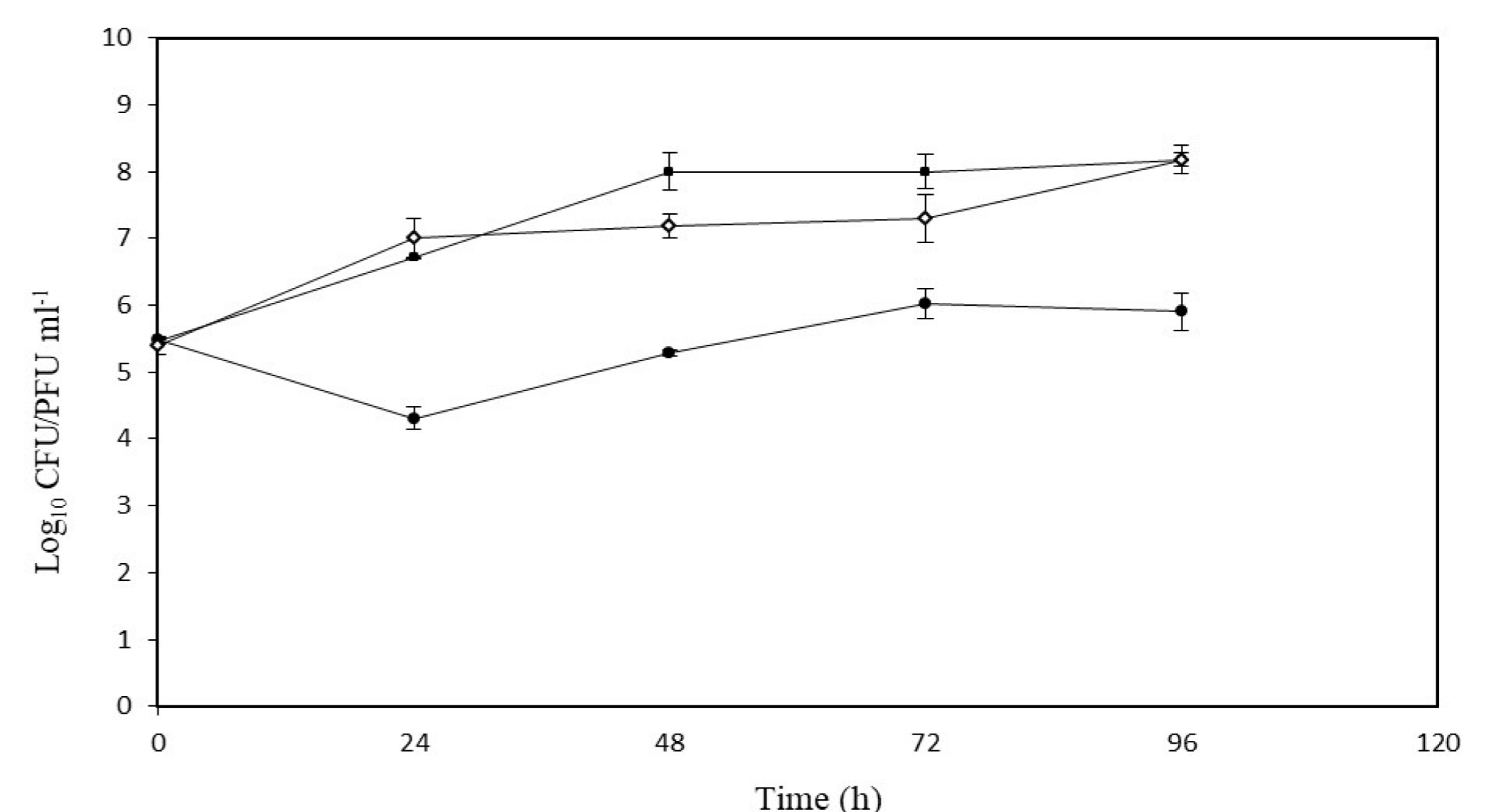


Fig.4 Le dinamiche della popolazione nel microcosmo di HBXCO1 e di *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) nel test (con HBXCO1) e nel controllo (senza HBXCO1). ● Vp test; ■ Vp controllo; ◇ HBXCO1.

Bibliografia

- [1] Andrews 2004. (2004). Strategies to control *Vibrios* in molluscan shellfish. Food Prot Trends 24: 70-76.
- [2] Barile et al 2009. (2009). Studio sull'efficacia di un sistema di depurazione a ciclo chiuso su molluschi bivalvi. Vet Ital. 45(4). 541-566
- [3] Croci et al 2002. (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. J Appl Microbiol 92: 460-465.
- [4] Mississippi Department of Marine Resources USA 2006. <http://www.dmr.state.ms.us/Fisheries/Seafood-Technology/pdfs/fact-sheet-postharvest-oysterprocessing.pdf2006>.