



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

TITOLO TESI (Italiano)

LO STATO VITALE MA NON COLTIVABILE E LA SUA IMPORTANZA NELLA SICUREZZA ALIMENTARE

TITOLO TESI (Inglese)

THE VIABLE BUT NON-CULTURABLE STATE AND ITS RELEVANCE IN FOOD SAFETY

Tesi di Laurea di:
di: CARDELLINO TANIA

Cardellino Tania

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

F. Biasini

Sessione STRAORDINARIA (FEBBRAIO 2020)

Anno Accademico 2019/2020

THE VIABLE BUT NON-CULTURABLE STATE AND ITS RELEVANCE IN FOOD SAFETY

LO STATO VITALE MA NON COLTIVABILE E LA SUA
IMPORTANZA NELLA SICUREZZA ALIMENTARE

Mesrop Ayrapetyan and James D Oliver,
Current Opinion in Food Science 2016, 8:127-133

Tania Cardellino

È UNO DEI GRANDI MISTERI DELLA MICROBIOLOGIA

Cellule vitali batteriche
in *campioni ambientali*



Cellule vitali batteriche
*in grado di crescere
su terreni di coltura*

Inabilità nel
coltivare queste cellule
con *metodi standard*

- Mancanza di specifici nutrienti nel mezzo
- Improprie condizioni di incubazione



1982
*Colwell
e colleghi*



Dimostrazione:

Cellule batteriche normalmente
coltivate in laboratorio



incubate in un AMBIENTE
NON CONSONO



Perdono
capacità di replicarsi
ma
mantengono la
loro vitalità



CELLULE VITALI
MA NON COLTIVABILI

TERMINOLOGIE ALTERNATIVE:

- ABNC - Active but non-culturable
- NGMA - Non-growing but metabolically active
- CELLULE DORMIENTI

SCOPERTA INIZIALMENTE CONTESTATA \longleftrightarrow Vitalità = Coltivabilità

ULTERIORE OSSERVAZIONE:

Cellule coltivabili *esposte ad assenza di nutrienti*

Cellule coltivabili
DIMINUISCONO

Numero di cellule vitali
totali
RESTA INVARIATO

PER TESTARE LA VITALITÀ

Metodi Di
Rilevamento
Alternativi

- coloranti che si legano al DNA
- indicatori redox
- sonde in grado di rilevare il potenziale di membrana
- uso di tecniche di citometria

STATO DI «ECLISSE» AMPIAMENTE ACCETTATO

come

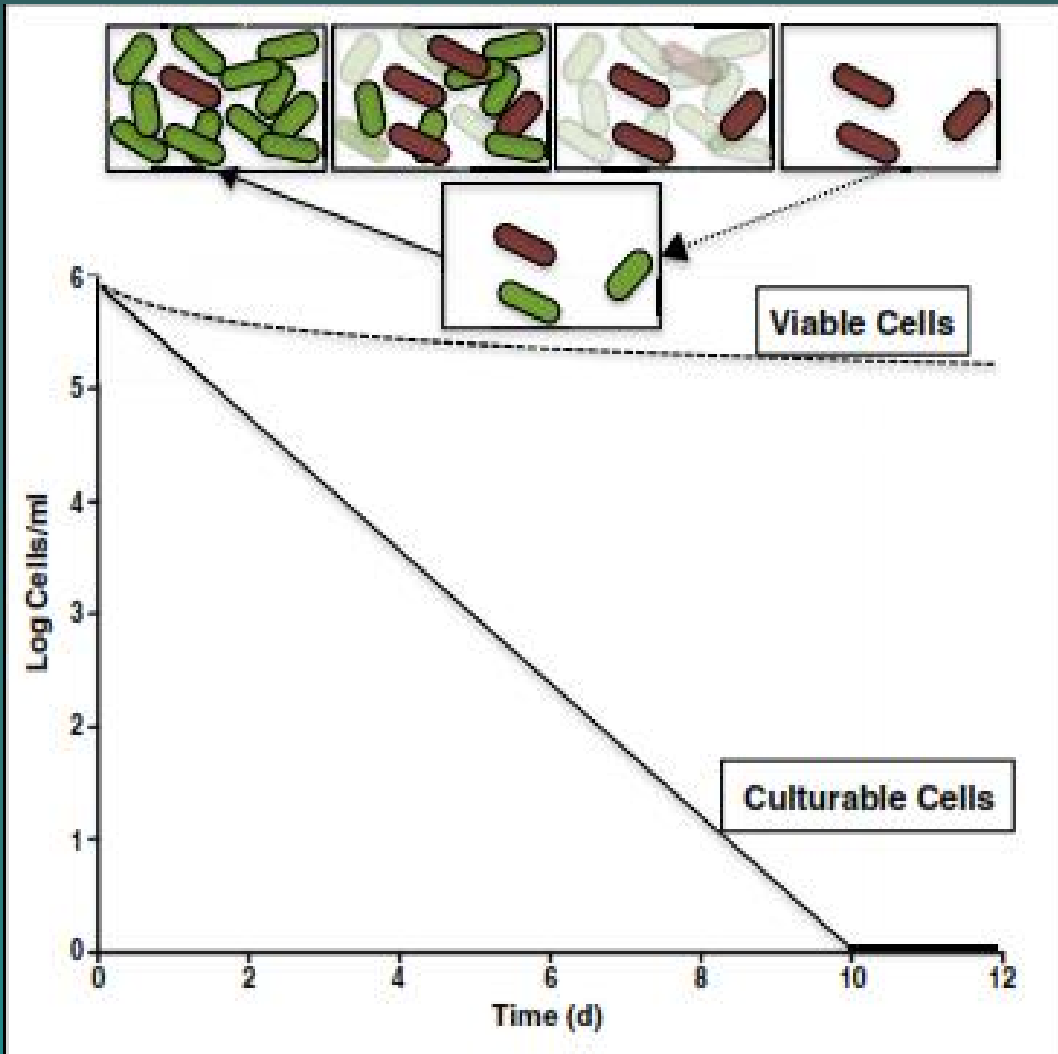
STRATEGIA DI SOPRAVVIVENZA

INDUZIONE DI FORME VBNC

CONDIZIONI DI STRESS

- Variazioni di TEMPERATURA e SALINITÀ
- ANOSSIA
- pH inadeguato

le condizioni che le inducono vengono *tollerate* dalle VBNC



Le VBNC differiscono dalle Cellule a Crescita Attiva per

- ❖ Riduzione delle DIMENSIONI
- ❖ Diversa COMPOSIZIONE DI PARETE e MEMBRANA
- ❖ Minore TASSO METABOLICO
- ❖ Diverso PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA
- ❖ Maggiore RESISTENZA fisica e chimica
- ❖ Cambiamenti nelle caratteristiche di ADESIVITÀ e VIRULENZA

M. Ayrapetyan and J. D Oliver, 2016

*Le *Cellule Morte* hanno la membrana danneggiata (perdono il DNA cromosomico e plasmidico)

LE CELLULE DORMIENTI POSSONO RESISTERE ANCHE A STRESS COME ANTIBIOTICI E FAGOCITOSI MACROFAGICA

Processi di DECONTAMINAZIONE del cibo
e di DISINFEZIONE
POSSONO INDURRE VBNC

Sono state trovate nei cibi e sulle superfici di acciaio inox nelle stanze di taglio degli impianti di processamento della carne bovina e sulle affettatrici dopo le procedure di pulizia e disinfezione

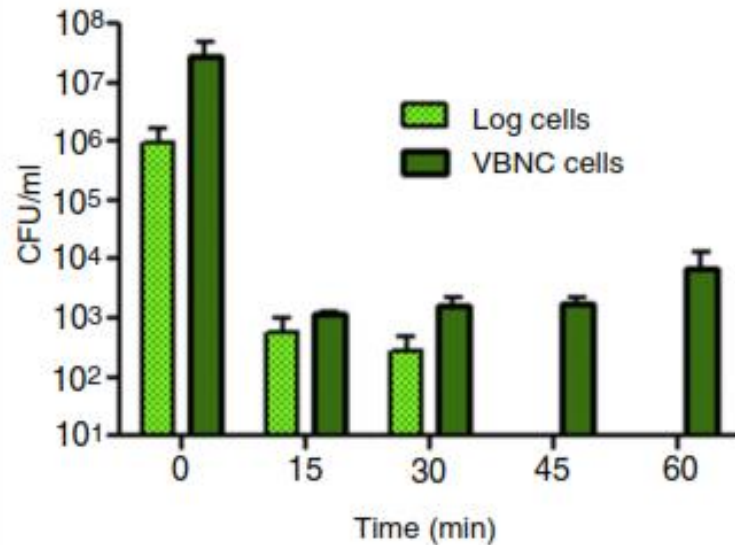
RISCHIOSO

- per la Salute Umana
- per PRECOCE DETERIORAMENTO di alimenti

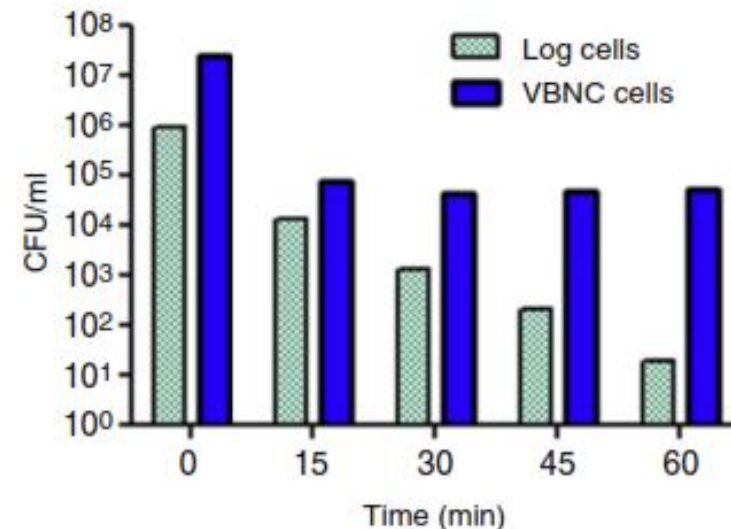
*Es.

E. coli e *P. aeruginosa* possono tollerare il trattamento con UV
E. coli *entoemorragico* forma VBNC in presenza di alte pressioni di anidride carbonica

Survival of *V. vulnificus* strain JY1701
Exposed to H₂O₂



Survival of *Vibrio vulnificus* JY1701
Exposed to 13% EtOH



Current Opinion in Food Science

V. vulnificus è un PATOGENO OPPORTUNISTA UMANO. Si trova nella microflora dell'ambiente estuarino e nei bivalvi ed esprime la sua *virulenza* in seguito ad ingestione di molluschi crudi o poco cotti, o attraverso la contaminazione di ferite.

Determina *malattia epatica o immunodeficienza*.

Tasso di mortalità pari al 50%.

Bassa temperatura → **Dormienza**

Aumento di temperatura → **Rianimazione**

Uno studio simile è stato condotto su *V. Parahaemolitic*. Stato di dormienza resistente a calore, bassa salinità, perossido di idrogeno, ma resta *sensibile ai sali biliari*

Da studi recenti..

VBNC SONO ONNIPRESENTI →

C'è sempre una subpopolazione in questo stato, pronta ad affrontare la rapida insorgenza di uno stress

IMPORTANTISSIMO STUDIARE I MECCANISMI DI FORMAZIONE E «RESUSCITATION» DELLE VBNC

Per imparare ad individuarle meglio e ad alterare la loro vitalità

NON È ANCORA STATO DESCRITTO UN MECCANISMO

MA

INDIVIDUATI **GENI** IMPORTANTI PER L' ENTRATA E L' USCITA DALLO STATO VBNC

PARTE DI QUESTI COINVOLTI NELLA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI

SISTEMI TOSSINA – ANTITOSSINA (TAS) di tipo II

Ambienti ostili causano disproporzionalità tra le due

Impatto su sintesi proteica e divisione cellulare

Arresto della crescita e quiescenza

Espressione di CATALASI nelle VBNC potrebbe essere indotta dal **QUORUM SENSING**

Risposta densità-dipendente a segnali chimici

Così VBNC possono essere riattivate

La perdita di CATALASI

Le cellule smettono di esprimere CATALASI ed entrano in *dormienza*, nonostante la presenza di nutrienti

I terreni di coltura contengono ROS, prodotti durante la sterilizzazione in autoclave

Studi recenti

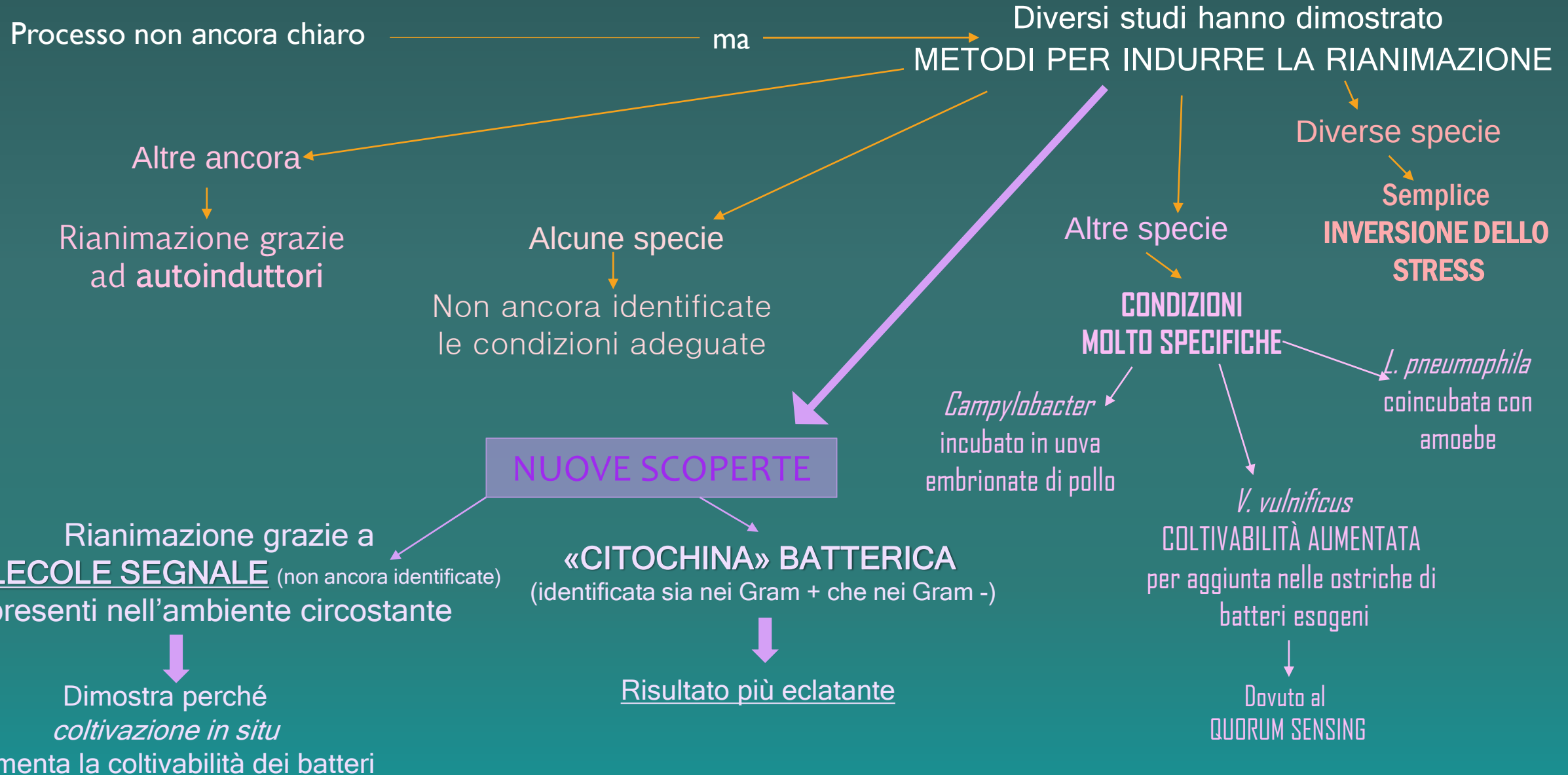
Contengono meno PEROSSIDO DI IDROGENO
Fosfato ed Agar sterilizzati separatamente in autoclave e uniti prima che solidificano

Aumento di cellule coltivabili

Hanno cercato di contrastare effetti dei ROS con
Aggiunta di *catalasi* e altri *antiossidanti* (come il *piruvato*)

Successo parziale

CAPACITÀ DI USCIRE DALLA DORMIENZA QUANDO LE CONDIZIONI ESTERNE DIVENTANO OSPITALI



PRESENZA DI VBNC IN ALIMENTI AMPIAMENTE DOCUMENTATA

CAPACI DI RIANIMARSI
NELL'OSPITE

Enorme rischio per la salute pubblica

Batteri come *Legionella pneumophila*,
E. coli, *Salmonella typhii* CONTINUANO
A PRODURRE FATTORI DI VIRULENZA

Acqua del rubinetto
può contenere VBNC

esposti a → VARIAZIONI AMBIENTALI

TECNICHE DI DISINFEZIONE
(che in alcuni casi inducono VBNC)

- Es.
- Luce pulsata
 - CO2 ad alta pressione
 - Temperatura elevata
 - Conservanti
 - Pastorizzazione

Recenti studi

RADIAZIONI
GAMMA

Metodo promettente
di decontaminazione

MITOMICINA C

Si è rivelato
POTENTE BATTERICIDA
contro diversi batteri
resistenti, a qualsiasi stadio

DOBBIAMO AVERE METODI PIÙ EFFICACI PER RILEVARE VBNC

Generalmente usata
COLORAZIONE DI VITALITÀ

DOPPIA COLORAZIONE
con CTC e DAPI

Fluorescenza in blu permette contrasto
per enumerazione simultanea di cellule
vive e totali

BacLight LIVE/DEAD

Usa *coloranti che legano l'acido nucleico*
SYTO verde-fluorescente → colora sia batteri vivi che morti
Iodio propidio rosso-fluorescente → penetra solo in batteri con membrane danneggiate

METODI MOLECOLARI sempre più usati per RILEVAZIONE e QUANTIFICAZIONE PIÙ EFFICACI

★ CITOMETRIA DI FLUSSO

Simile a microscopia vitale, ma *più sensibile e specifica* (meno potenziale d'errore)



Generalmente accoppiata con
COLORAZIONE DI VITALITÀ

★ qRT-PCR

Ottimo strumento perché cellule VBNC continuano a produrre mRNA

★ RING-FISH

Rilevazione di singoli geni in singola cellula batterica (a differenza di FISH, che prende di mira molti geni)

★ PMA-qPCR

AMPLIFICA e QUANTIFICA DNA di cellule intatte

Adottandolo nel monitoraggio di routine → enumerazione accurata per migliore igiene e ridotta incidenza di infezioni

Non tutte le cellule con membrane intatte sono vive → può falsare i risultati

Combinato con ibridazione in situ si ha QUANTIFICAZIONE più efficace

★ METODO DI CONTEGGIO DIRETTO modificato

Usa NOVIOBIOCINA (inibisce DNA girasi) e IBRIDAZIONE FLUORESCENTE in situ

★ BIOSENSORI

Integrano RILEVAMENTO MOLECOLARE con
SISTEMA DI TRASDUZIONE

per
PRODURRE SISTEMA ELETTRICO MISURABILE
(o *USCITA OTTICA*)

Diversi VANTAGGI:

- ❖ RILEVAMENTO RAPIDO
- ❖ ELEVATA SPECIFICITÀ

- ☛ • Strumento che RILEVA entro 20 min. attività di Beta-D-glucuronidasi

- Limite di rilevamento:
2 cell x 100 mL di acqua

- ☛ • Sensore basato su Aptamer per rilevare VBNC di *S. typhimurium*

- Limite di Rilevamento:
18 cell x 30 mL

- ☛ • Strumento che utilizza anticorpi anti-*E. coli* e rileva la formazione di immunocomplessi

- Limite di rilevamento:
22 cell x mL

- ☛ • Batteriofagi immobilizzati possono distinguere VBNC da cell morte

- Limite di rilevamento:
3-4 cell x sensore

..C'è ancora tanto da fare perché i BIOSENSORI diventino l'ALTERNATIVA a metodi convenzionali

Recentemente SCOPERTI METODI PER SEPARARE CELLULE IN BASE AL LORO STATO FISIOLÓGICO

PACKARD et al.

DIELETTROFORESI di cellule

- A frequenze specifiche di campo e.m., VBNC si comportano diversamente da cellule morte
- Ci permette di concentrare le cellule per ulteriori analisi

DILER et al.

Metodo basato sul LISOZIMA con sito catalitico mutato e viene immobilizzato

- Accoppiato con perline magnetiche → legano e separano le cellule con parete intatta

No differenza tra VBNC e cell coltivabili

Può legare e rilevare VBNC su supporti di laboratorio

CONCLUSIONE

VBNC MOLTO IMPORTANTI per loro NATURA SURRETTIZIA

Possono trovarsi in

- Acqua potabile
- Acqua per purificare cibi
- Prodotti alimentari
- Apparecchiature mediche invasive

Ancora TANTO DA STUDIARE PER IL LORO RILEVAMENTO

Poterle eliminare sempre più efficacemente

Costituiscono una fonte di nuove importanti scoperte biologiche

RINGRAZIAMENTI:

Ringrazio la mia famiglia, mio padre, mia madre e mio fratello Luca: questo percorso lo devo a voi e ai vostri continui sacrifici, ma vi ringrazio soprattutto per avermi lasciato commettere degli errori ed aiutato a porvi rimedio!

Ringrazio il mio fidanzato Davide che ha sopportato tanti miei malumori e mi ha regalato spesso spensieratezza; ringrazio anche tutta la sua famiglia e le sue nipotine per le domeniche di gioco.

Ringrazio le mie amiche Valeria, Monica, Rovena, Mariagrazia, Eleonora e mia cugina Ersilia per tutte le volte che mi hanno ascoltata e consolata e per tutte le risate condivise!

Ringrazio la professoressa Francesca Biavasco per l'assoluta disponibilità.

RIASSUNTO

Lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC) è una forma di dormienza che molti batteri impiegano come metodo di sopravvivenza e può essere trovato in quasi tutte le nicchie biologiche.

Le caratteristiche principali che distinguono le cellule dormienti sono la loro capacità di eludere il rilevamento mediante la normale coltura di laboratorio, di tollerare condizioni stressanti, compresi i processi di pastorizzazione degli alimenti e degli antibiotici, e di rianimare all'interno dell'ospite e causare malattie. Date le loro caratteristiche distintive, questi microbi resilienti destano molta preoccupazione per l'industria alimentare e per la salute di coloro che consumano cibi che ospitano agenti patogeni elusivi.

Questo articolo offre una panoramica dello stato VBNC, la sua relazione con la sicurezza alimentare e dei nuovi metodi sviluppati per il rilevamento e l'identificazione rapidi di cellule VBNC.