

# VALUTAZIONE IN VITRO DELL'EFFETTO DI SIDEROFORI SU *E. COLI* O157:H7

## ***EFFECT OF SIDEROPHORES AGAINST E. coli O157:H7***

Giarratana F., Ziino G., Signorino D., Giordano L., Giuffrida A.  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria – Università di Messina

### **SUMMARY**

In this study, the inhibiting activity of siderophores produced by *Pseudomonas fluorescens* against *Escherichia coli* O157:H7 was assayed. Siderophores were extracted from *P. fluorescens* cultures and preliminarily tested by C.A.S. reagent and UV. The siderophores activity against *E. coli* O157:H7 was characterised by the determination of Minimal Inhibiting Concentration (MIC). Furthermore, *E. coli* O157:H7 growth tests with and without siderophores were prepared at 12°C, pH 7 and 5, aw 0.997 and 0.988. The MIC was assessed at 7 µg/ml whereas the growth test showed a high inhibiting activity with the exception of tests at pH 5.

### **KEYWORDS**

siderophores, *E.coli* O157:H7, inhibiting activity, food safety.

### **INTRODUZIONE**

I siderofori sono sostanze a basso peso molecolare (< 1KD), prodotte da diversi tipi di microrganismi e dalle piante, capaci di legare il Fe<sup>3+</sup> e di facilitarne il trasporto intracellulare in funzione della loro idrosolubilità e di specifici recettori di membrana (1). In relazione alla elevata affinità con il ferro, sono considerati agenti chelanti, poiché attraverso gli atomi di ossigeno legano e trasportano il ferro, formando un complesso molto stabile. Dal punto di vista strutturale, tali sostanze possono essere suddivise in catecolati, idrossammati, fenolati e carbossilasi, sebbene esistano forme chimiche più complesse come la Pioverdina, prodotta da alcune specie di *Pseudomonas* fluorescenti, definite Idrossicatecolati, poiché possiedono sia il gruppo funzionale degli Idrossammatti che quello dei Catecolati (1). La sintesi di tali molecole è finemente controllata da una cascata di regolatori trascrizionali positivi e negativi (2), che assicurano l'espressione dei geni da cui deriva la produzione dei siderofori, in relazione alle esigenze nutrizionali del microrganismo. In particolare, la bassa biodisponibilità di ferro nell'ambiente viene recepita da proteine sensori presenti a livello dello spazio periplasmatico, le quali attivano, mediante la scissione dell'ATP, meccanismi genetici di produzione di tali sostanze (1). I siderofori così secreti, si legano al Fe<sup>3+</sup> e detto

complesso viene riconosciuto da specifici recettori cellulari situati nella membrana esterna (3). Nei funghi e in altri eucarioti il complesso ferro-sideroforo può essere ridotto a Fe<sup>2+</sup> a livello extracellulare, mentre nella maggior parte dei casi l'intero complesso ferro-sideroforo è attivamente trasportato attraverso la membrana cellulare. Nei batteri Gram-, il complesso viene trasportato nel periplasma attraverso recettori TonB e viene successivamente trasferito nel citoplasma mediante trasportatori ABC (ATP-binding cassette transporters) (4). Gli ABC-transporter utilizzano l'energia di idrolisi dell'ATP per trasportare il complesso attraverso la membrana cellulare (5). Nel citoplasma il complesso rilascia il Fe<sup>2+</sup> che viene ridotto enzimaticamente (ferro-chelato reduttasi) a Fe<sup>2+</sup>, divenendo quindi disponibile per le funzioni cellulari. Con meccanismi simili, i siderofori vengono inoltre utilizzati anche per il trasporto di altri microelementi, come il cobalto e il molibdeno (6).

I suddetti complessi meccanismi di produzione, trasporto e utilizzo dei siderofori, fanno sì che tali sostanze siano estremamente eterogenee, assolvendo alla necessità dei batteri di produrre composti strutturalmente differenti che i sistemi di trasporto attivo specifici degli altri microrganismi non siano in grado di riconoscere (7). Nonostante ciò, sono stati diversi i contributi scientifici volti a dimostrare l'effetto inibente

di alcuni siderofori su varie specie di microrganismi (8, 9), in base alla possibilità che tali sostanze, depurate dal ferro, possano sottrarre questo elemento ai batteri inibendone dunque i sistemi enzimatici utili alla loro crescita. Ciò, soprattutto, per quei batteri (specie gram -) che impiegano la produzione e/o l'assorbimento di siderofori, rispettivamente, omologhi ed eterologhi, come fonte primaria per l'acquisizione del ferro. A partire da tali aspetti, infatti, nel campo dell'igiene degli alimenti, è stata dimostrata l'attività inibente di alcune Pseudomonadaceae su altri batteri alteranti (8) e/o su alcuni agenti di alimentare (9). Alla luce di ciò, scopo del presente lavoro è quello di valutare l'effetto di siderofori eterologhi, prodotti da un ceppo di *Pseudomonas fluorescens*, sul comportamento in vitro di *Escherichia coli* O157:H7.

## MATERIALI E METODI

Per la presente sperimentazione è stato impiegato un ceppo di *Pseudomonas fluorescens* preventivamente identificato e saggiato per la produzione di siderofori, in precedenti ricerche (9). L'estrazione dei siderofori avveniva a partire da colture del microrganismo in "brodo di pesce" (10), incubate a 32° C per circa 7- 10 giorni fino all'ottenimento di una colorazione giallo verdastro. Successivamente la brodocoltura veniva centrifugata a 5000 rpm x g per 30 minuti a 4° C (6), procedendo alla raccolta del surnatante. Il surnatante veniva quindi acidificato a pH 2 con HCl 0,1 N, al fine di modificare la solubilità dei siderofori deprivandoli, nel contempo, del ferro. Dette modificazioni erano evidenziate da un repentino viraggio di colore della brodocoltura che da giallo-verdastro diveniva incolore.

Si procedeva quindi ad una estrazione liquido-liquido con 0,4 Volumi di Acetato di Etile per tre volte mediante imbuto separatore di volume adeguato. Si effettuava la raccolta di tutto l'Acetato di Etile in un pallone, precedentemente pesato con bilancia di precisione (0,1 mg), e portato a secco mediante rotavapor a 65° C, collegato a pompa del vuoto (6). Il pallone, previo passaggio in essiccatore per eliminare tracce di solvente, veniva nuovamente pesato al fine di determinare la quantità di siderofori estratti che venivano sospesi in 3 ml di soluzione salina allo 0,9%. Gli estratti venivano saggiati per la presenza di siderofori mediante reattivo C.A.S. e osservazione con raggi U.V..

Il potenziale effetto inibente dei siderofori nei confronti di *E. coli* O157:H7 si valutava, preliminarmente, mediante determinazione della Concentrazione Minima Inibente (M. I. C.) secondo la metodica ISO/TC 76 standards, del "Clinical and Laboratory Standard Institute 2006", impiegando concentrazioni di siderofori

pari a 112,00 - 56,00 - 28,00 - 14,00 - 7,00 - 3,50 - 1,75 - 0,87 - 0,43 µg/ml. Successivamente si allestivano prove di crescita del suddetto microrganismo in assenza e in presenza di siderofori a concentrazione nota (7 e 21 mg/l), alle seguenti condizioni ambientali: T 12°C, pH 5 e 7, aw 0,997 e 0,980. Le sospensioni di *E. coli* O157:H7 avevano una concentrazione iniziale pari a Log 4,02 ufc/ml ad eccezione di due prove in cui si impiegava una concentrazione pari a Log 0.43 ufc/ml.

## RISULTATI

La valutazione degli estratti in Acetato di etile mediante reattivo C.A.S. e raggi UV consentiva di evidenziare la positività per i siderofori. La valutazione della MIC ha consentito di evidenziare attività inibente per il ceppo di *E. coli* O157:H7 fino alla concentrazione di 7 µg/ml. Per quanto riguarda, inoltre, le prove di crescita, i risultati sono espressi nelle figure 1-4. In particolare, a pH 7 e aw 0.997 (Fig. 1), il ceppo posto in coltura con 7 µg/ml e 21 µg/ml di siderofori mostrava una tendenza al decremento, senza significative differenze in funzione della concentrazione, a differenza test controllo (0 µg/ml) nel quale si evidenziava un normale comportamento di crescita. Stessi aspetti venivano registrati anche a pH 7 e aw 0.980 (Fig. 2). Nelle prove a pH 5, invece, non si registrava alcuna differenza tra test controllo e test con siderofori, sia a 7 che a 21 µg/ml.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti mostrano come i siderofori prodotti da *Pseudomonas fluorescens* abbiano un'elevata attività inibente nei confronti di *E. coli* O157:H7 anche a concentrazioni relativamente basse (7 µg/ml). Detta attività è probabilmente da imputare, in accordo a Miethke e Marahiel (2007) (2), al peculiare meccanismo di captazione del ferro da parte degli *E. coli*, basato, quasi esclusivamente, sull'impiego dei siderofori omologhi o eterologhi. Nel nostro studio, l'impiego di siderofori eterologhi deprivati dal ferro, ha, evidentemente, determinato una condizione di captazione degli stessi, da parte del microrganismo saggiato, senza, però, che a ciò seguisse un reale assorbimento del ferro, con la conseguente inibizione dei meccanismi metabolici del batterio.

In riferimento alla mancata attività inibente a pH acidi, è possibile ipotizzare una modificazione strutturale dei siderofori, tale da impedirne il riconoscimento da parte dei recettori di membrana batterici.

Riteniamo in conclusione, che lo studio in oggetto possa rappresentare un interessante punto di

partenza nell'ottica del potenziale impiego dei siderofori nell'industria alimentare quali inibitori di alcuni agenti di tossinfezione alimentare, integrando, nel contempo i risultati di altri studi inerenti l'attività inibente di diversi ceppi di *Pseudomonas* spp. su altri agenti alteranti e/o di tossinfezione alimentare (8, 9).

## BIBLIOGRAFIA

1. Meldrum A.J. (1999). Regulation of Pyoverdine Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Tesi: *Queen's University Kingston*, Ontario, Canada.
2. Miethke M., Marahiel M. (2007). Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 22, 413–451.
3. Neilands J.B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal Biological Chemistry*. 270, 26723–26726.
4. Roosenberg J.M.I, Lin Y.M., Lu Y. e Miller M.J. (2000). Studies and Syntheses of Siderophores, Microbial Iron Chelators, and Analogs as Potential Drug Delivery Agents. *Current Medicinal Chemistry* 7, 159–197.
5. Faraldo-Gómez J.D, Sansom M.S.P. (2003). Acquisition of siderophores in Gram negative bacteria. *Molecular Cell Biology*. 4, 105-116.
6. Visca V., Colorii G., Serino L., Versili D., Orsi N., Chiancone E., (1992). Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2886-2893.
7. Miller M.J. (2008). Siderophores (microbial iron chelators) and siderophore-drug conjugates (new methods for microbially selective drug delivery). Tesi: *University of Notre Dame*, Paris.
8. Champomier-Verges M., Richard J. (1994). Antibacterial activity among *Pseudomonas* strains of meat origin. *Letters in Applied Microbiology* 18, 18–20.
9. Giarratana F., Giuffrida A., Ziino G. (2009). Studio sulla produzione di siderofori in batteri alteranti di origine ittica e loro effetto sul comportamento di *Aeromonas hydrophila*. *Atti SISVet* 51, 377-388
10. Gram L. (1996). The influence of substrate on siderophore production by fish spoilage bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 25, 199-205.