

Studio sull'efficacia di un sistema di depurazione a ciclo chiuso su molluschi bivalvi

Nadia B. Barile, Mariaspina Scopa, Eliana Nerone, Giuseppina Mascilongo, Sara Recchi, Sabatino Cappabianca & Luigi Antonetti

Riassunto

Obiettivo del presente studio è stato la messa a punto ed applicazione di protocolli per la depurazione microbiologica dei molluschi bivalvi (*Chamelea gallina* e *Mitylus galloprovincialis*). Lo studio è stato articolato nelle seguenti fasi: allestimento di n.2 vasche a circuito chiuso, per la depurazione dei molluschi bivalvi, dotate di sistemi di filtrazione meccanica, chimica e biologica; contaminazione e la depurazione dei molluschi bivalvi; determinazioni analitiche sui molluschi bivalvi e sulle acque di depurazione (analisi biometriche e microbiologiche); l'elaborazione dei dati ottenuti nella fase sperimentale. Il challenge effettuato con *Escherichia coli* ha mostrato un'elevata efficacia del sistema di depurazione utilizzato e, di conseguenza, la possibilità di commercializzare i bivalvi in tempi relativamente brevi. Le prove di depurazione verso *Salmonella Typhimurium*, sono state efficaci solo dopo 72-84 ore. I risultati ottenuti utilizzando *Vibrio parahaemolyticus* hanno mostrato una scarsa diminuzione della carica batterica dei bivalvi durante tutto il periodo di osservazione. Di contro, nelle sperimentazioni condotte con i mitili, i tempi di depurazione sono stati più brevi. In particolar modo, sono stati rilevati valori assimilabili alla assenza di *V. parahaemolyticus* dopo 36-48 ore.

Parole chiave

Depurazione, Italia, *Chamelea gallina*, Mitili, Molluschi bivalvi, *Mitylus galloprovincialis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*,

Sicurezza alimentare, *Vibrio parahaemolyticus*, Vongole.

Introduzione

Inquadramento generale

La pesca dei molluschi bivalvi, in Italia, costituisce una frazione limitata dell'intera struttura produttiva nazionale. Tuttavia le attività di questo settore, diffuse in vaste aree delle nostre coste, rivestono un'importanza sociale molto elevata, tale da indurre il Ministero delle Politiche Agricole e le Regioni al rafforzamento strutturale del comparto ed ad una più efficace organizzazione degli addetti (16). Tra i molluschi bivalvi di maggiore interesse commerciale la vongola (*Chamelea gallina*, Linnaeus, 1758) rappresenta, lungo la costa adriatica, un patrimonio singolare e determina un ragguardevole numero di occupati tra primario ed indotto. Attualmente la produzione nazionale si aggira sulle 50.000 tonnellate/anno

La vongola *C. gallina* è un mollusco appartenente alla famiglia *Veneridae* avente un'ampia distribuzione nel Mediterraneo. Nei mari italiani è assai comune soprattutto nell'Adriatico, nelle zone settentrionale e centrale, dalle coste occidentali più settentrionali all'altezza del promontorio del Gargano; è inoltre localmente presente in aree ioniche e in basso e medio Tirreno. La vongola vive su fondali sabbiosi o sabbioso-fangosi, con distribuzione aggregata, in prossimità della costa, a bassa profondità da 0 a 15 m. Da un punto di vista morfologico si presenta con

conchiglia dalle valve uguali, di forma quasi triangolare, ristretta nella parte superiore, slargata ed arrotondata al margine; presenta una fossetta sul margine anteriore nei pressi dell'umbone che risulta piuttosto piccolo e rivolto in avanti. Le valve sono robuste e piuttosto rigonfie superiormente e presentano sulla parte esterna numerose ed evidenti costole concentriche spesso incrociate da strie radiali molto sottili ed irregolari. La colorazione esterna è biancastra o bianco-grigiastra, con punti, striature e linee spezzate brune solitamente disposte in fasce radiali; internamente è biancastra con una macchia violacea sulla parte posteriore.

I bivalvi sono organismi che si alimentano filtrando particellato organico dall'acqua "ambiente", pertanto sono naturalmente esposti al rischio di accumulo di inquinanti biologici e chimici (organismi patogeni, biotossine algali o metalli). In particolare le specie che vivono sul fondale marino, come le vongole si trovano a stretto contatto con il sedimento, che generalmente risulta più ricco di inquinanti rispetto alla colonna d'acqua. Inoltre va considerato che le aree di pesca di *C. gallina* sono localizzate entro un chilometro dalla costa, dove i molluschi sono maggiormente esposti ai carichi inquinanti di origine terrestre.

Sebbene i bivalvi debbano essere vivi al momento dell'acquisto, la vitalità non costituisce di per sé una garanzia di salubrità in quanto il prodotto può essere contaminato all'origine nell'ambiente acquoso ed anche nelle fasi di manipolazione, trasporto e distribuzione. Quindi, a tutela della salute del consumatore, sono state fissate delle norme igienico-sanitarie che attraverso la difesa della qualità del prodotto ne garantiscono la salubrità. Tali norme prevedono oltre alla classificazione delle acque dove i bivalvi vivono, anche - per i molluschi provenienti da zone di produzione con particolari requisiti - l'obbligo di depurazione in appositi Centri alimentati con acque marine pulite. La sicurezza alimentare delle produzioni costituisce da sempre il nodo cruciale sul quale si articola l'interesse nei confronti della

molluschicoltura. Infatti le attività di monitoraggio condotte negli organismi e nell'ambiente in cui questi vivono, hanno esclusivamente l'obiettivo di garantire la salubrità alimentare attraverso la rispondenza a requisiti normativi di tipo igienico sanitario. In tale ambito alcuni regolamenti comunitari in tema di sicurezza alimentare (11, 12) stabiliscono i parametri di salubrità igienico sanitaria dei molluschi bivalvi destinati al consumo umano; alcuni di questi sono riferibili a valori microbiologici quali *Escherichia coli* e *Salmonella* non correlabili tra loro ma i cui limiti ne determinano la commercializzazione.

Le zone di produzione sono attualmente classificabili (12, 13) da un punto di vista sanitario, in base al parametro *E. coli* determinato sulla parte edibile del mollusco e relativo liquido intervalvare. In funzione del livello di contaminazione di quest'ultimo si classificano:

- "1) zone A: i M.B.V. che provengono da queste zone non devono superare i livelli di *E. coli* di 230 mpn per 100 g di polpa e liquido intervalvare": I molluschi possono essere raccolti e utilizzati per il consumo umano diretto senza nessuno trattamento preventivo
- "2) zone B: i M.B.V. raccolti in queste zone non devono superare i valori di *E. coli* di 4.600 mpn per 100 g di polpa e liquido intervalvare": i molluschi possono essere raccolti e destinati al consumo umano solo dopo aver subito un trattamento in un centro di depurazione o previa stabulazione in una zona avente i requisiti microbiologici, biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A. Possono, nel caso non siano depurati, essere avviati alla trasformazione in stabilimenti riconosciuti dopo adeguato trattamento termico
- "3) zone C: i M.B.V. raccolti in queste zone non devono superare i valori di *E. coli* di 46.000 mpn per 100 g di polpa e liquido intervalvare": i molluschi possono essere destinati al consumo umano diretto esclusivamente previa stabulazione, per un periodo non inferiore a due mesi, in una zona avente i requisiti microbiologici,

biologici, chimici e fisici prescritti per la zona A, oppure essere avviati alla trasformazione in stabilimenti riconosciuti dopo adeguato trattamento termico.

- "4) zone precluse: qualora i valori di *E. coli* riscontrati siano >46.000 mpn per 100 g di polpa e liquido intervalvare" vi è il divieto di raccolta nella zona con tali requisiti.

Il prodotto pronto per la vendita deve essere inoltre esente da *Salmonella* (1).

La depurazione, effettuata in centri riconosciuti dal Ministero della Salute, deve consentire ai molluschi di raggiungere i parametri precedentemente citati mediante il rilascio della contaminazione residua. I molluschi devono essere messi nelle condizioni di riprendere rapidamente la nutrizione mediante filtrazione e devono mantenere intatta la loro vitalità.

In considerazione delle peculiarità dell'habitat di *C. gallina*, è evidente che la depurazione di molluschi provenienti da aree non idonee al consumo diretto (zona B, C), ancorché classificate ai fini del prelievo, rappresenta un trattamento indispensabile per recuperare enormi quantità di prodotto che diversamente potrebbe essere immesso nel circuito distributivo soltanto dopo aver subito adeguati trattamenti termici. I molluschi della specie *C. gallina* mostrano una particolare sensibilità agli stress ambientali, e sono notoriamente meno efficienti in quanto a capacità filtrante rispetto ad altri molluschi bivalvi tanto è vero che nella normativa in vigore fino al 1992 non erano inseriti fra le specie depurabili. In considerazione di questi aspetti, si è discusso a lungo sulla loro adattabilità al processo di depurazione e sulla reale efficacia dello stesso. Nel presente studio sono state effettuate prove per sperimentare l'efficacia della depurazione nei confronti di patogeni quali *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus*, di organismi appartenente alla specie target comparate con prove effettuate anche con organismi appartenenti alla specie *Mitylus galloprovincialis* (specie considerata depurabile e con elevata capacità di filtrazione) al fine di poter confrontare l'efficienza della depurazione dei protocolli sperimentali in specie con differenti capacità di filtrazione.

Sistemi di depurazione

I sistemi di depurazioni attualmente in uso possono essere distinti in sistemi a flusso continuo (aperti) e sistemi a ricircolo (chiusi). I diversi sistemi presentano vantaggi e svantaggi diversi, pur rimanendo entrambi efficaci. Il sistema a flusso continuo necessita di un maggiore quantitativo d'acqua del sistema chiuso. D'altro canto in un sistema chiuso, l'acqua di mare è riutilizzata con un ricambio del 5-10% nelle 24 ore, e deve essere trattata fisicamente (radiazione UV) o chimicamente (cloro o ozono) per evitare la contaminazione microbica.

I metodi di disinfezione delle acque destinate alla depurazione dei molluschi si basano sulla utilizzazione di particolari agenti chimici, quali cloro, iodofori ed ozono o agenti fisici quali UV e filtrazione (2). La depurazione con il cloro è stato il primo procedimento usato e sebbene sia efficace nel ridurre la contaminazione batterica non risulta altrettanto efficace nei confronti dei virus enterici. Inoltre il cloro, anche a bassi livelli di concentrazione, può influenzare l'attività di filtrazione dei molluschi e quindi il cloro residuo nell'acqua deve essere abbattuto mediante tiosolfato e aereazione prima che l'acqua venga immessa nelle vasche di depurazione. Il trattamento con il cloro sebbene sia efficace contro i batteri enterici, non risulta esserlo contro le spore batteriche, i virus ed i protozoi. Inoltre il rischio di prodotti secondari mutageni o cancerogeni prodotti durante il trattamento di clorazione, fanno sì che tale sistema non sia utilizzato in modo esclusivo nei processi di depurazione.

Gli iodofori vengono utilizzati a concentrazioni che vanno da 0,1 a 0,4 mg/l; essi non hanno alcun apparente effetto sulla attività dei molluschi e sulle loro caratteristiche di edibilità, riducono in breve tempo la quantità di batteri presenti, ma non sono efficaci nei confronti dei virus enterici se non a concentrazioni che danneggiano i molluschi stessi (il virus dell'epatite A [HAV] viene inattivato a concentrazioni di iodio attivo superiori a 100 ppm).

La radiazione ultravioletta è un meccanismo di disinfezione efficace ed ampiamente utilizzato nei sistemi di depurazione per la purificazione dell'acqua. I raggi UV eliminano i microorganismi enterici (batteri e virus) e le spore di protozoi e batteri, senza la produzione di prodotti tossici o altri residui chimici. Lo svantaggio dei raggi UV è che, sotto certe condizioni, alcuni microorganismi inattivati dalla radiazione possono riparare i danni cellulari e riattivarsi. In alcuni microorganismi, in particolar modo i batteri, gli effetti mutageni delle lunghezze d'onda ricadenti nell'UV possono essere riparati quando esposti a lunghezze d'onda ricadenti nel visibile (320-400 nm). I sistemi che utilizzano le lampade UV per la disinfezione devono utilizzare filtri per eliminare il materiale in sospensione, poiché la presenza di particolato sospeso limita la penetrazione dei raggi UV, e quindi riduce l'efficacia di questo trattamento. Proprio per queste ragioni questo metodo comporta costi di esercizio molto elevati.

L'utilizzo della disinfezione mediante ozonizzazione ha avuto un incremento negli ultimi anni anche nel nostro Paese. L'ozono agisce sui batteri con azione combinata di ossidazione delle proteine, alterazione delle strutture molecolari e blocco enzimatico. I virus sono soggetti allo stesso processo di eliminazione dei batteri, con la differenza che l'ossidazione delle loro proteine avviene più facilmente in quanto privi di membrana cellulare.

Una volta depurata, l'acqua viene immessa in apposite vasche dove vengono posti a stabulare i mitili che, attraverso il loro naturale sistema di filtraggio riescono a purificarsi dei microrganismi accumulati. La combinazione di diversi meccanismi di trattamento delle acque aumenta l'efficienza di depurazione e diminuisce il tempo richiesto per completare il processo. I tempi di depurazione attualmente in uso (12-24 ore) si basano comunque su parametri batteriologici, ma è stato ormai più volte provato che i tempi di rilascio dei virus sono più lunghi di quelli necessari per i batteri di origine fecale o batteri patogeni. Inoltre è ormai ampiamente documentato il fatto che la presenza di virus non è sempre correlata alla

presenza di batteri di origine fecale. Infine, vanno anche considerati i vibrio: molte specie di sono parte della flora batterica acquatica autoctona e circa metà di essi è stata associata in modo più o meno definitivo con infezioni nell'uomo o in animali acquatici. Alcune infezioni da vibrioni rivestono una certa importanza, poiché comprese fra quelle malattie che richiedono quarantena ed obbligo di notifica alla *World Health Organization* (es. *V. cholerae*), perché note per causare alta mortalità (es. *V. vulnificus*) o perché causa di un alto numero di tossinfezioni in alcuni Paesi (es. *V. parahaemolyticus* in Giappone) temperate di tutto il mondo.

Tali osservazioni motivano la scelta del sistema di depurazione sperimentato (sistema chiuso dotato di meccanismi chimici e fisici per il trattamento dell'acqua) e dei patogeni utilizzati per la contaminazione (*S. Typhimurium*, *E. coli* e *V. parahaemolyticus*).

Materiali e metodi

Organismi utilizzati nella sperimentazione

Modalità di campionamento

I campioni di vongole sono stati prelevati alla distanza di 200 m dalla foce di Rio Vivo (litorale sud-Termoli) e della foce del Trigno (litorale nord-Termoli). I campionamenti sono stati effettuati mediante imbarcazioni munite di draghe con turbosoffianti. I campioni di mitili utilizzati nelle prove di depurazione sono stati prelevati da banchi naturali prossimi alla foce Rio Vivo (litorale sud-Termoli) e presso l'impianto di mitilicoltura Lagmar (litorale nord-Termoli). Gli organismi (taglia media: 25-32 mm per le vongole e 5-8 cm per i mitili) sono stati trasportati in laboratorio in contenitori refrigerati (4°C) e sottoposti ad ispezione.

Preparazione degli organismi alla sperimentazione (Cernita ed Acclimatazione)

Gli organismi morti o danneggiati sono stati eliminati, mentre i rimanenti sono stati suddivisi in aliquote di 100 vongole o 50 mitili. Prima della sperimentazione, gli organismi

sono stati acclimatati in acquari con acqua di mare artificiale (*Instant Ocean Aquarium System*, Salinità 35 ‰) per confermare la vitalità e la capacità di filtrazione (Figura 1).



Figura 1
Vasca di acclimatazione degli organismi bivalvi

Esame batteriologico degli organismi bivalvi

Alcuni esemplari, prelevati nei medesimi siti degli organismi utilizzati per le sperimentazioni, sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *V. parahaemolyticus*) al fine di valutare la carica iniziale di ciascun patogeno e quindi definire le cariche per la contaminazione.

Contaminazione dei campioni

Ceppi batterici utilizzati

I ceppi batterici utilizzati per la sperimentazione sono stati *E. coli* ATCC 25922, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.

Modalità di contaminazione

La contaminazione degli organismi è stata effettuata in vasche della capacità di 8 litri e volume di circa 0.12 m³ con acqua di mare artificiale (Figura 2 e 3), contaminate con inoculi di sospensioni batteriche specifiche tali da raggiungere le seguenti concentrazioni in acqua:

- 1.87*10⁴; 3.75*10⁴ *E. coli*/ml
- 9.37*10³; 1.87*10⁴ *S. Typhimurium* /ml
- 9.37*10³; 1.87*10⁴; 3.75*10⁴ *V. parahaemolyticus*/ml.

Gli organismi sono stati esposti alla contaminazione per 60-70 ore e quindi trasferiti in sistemi di depurazione.



Figura 2
Contaminazione di organismi di *Chamelea gallina*

Depurazione dei molluschi

Sistema di depurazione utilizzato

Gli impianti di depurazione utilizzati sono costituiti da vasche di dimensioni 197 × 72 × 45 cm, dotate di pre-filtro in lana/Perlon e filtro carbone iperattivo, filtro biologico a filtrante attivo con alga *Lithothamnium calcareum* ed impianto di sterilizzazione a raggi ultravioletti (Figura 4).

La Figura 5 riporta in dettaglio lo schema dell'impianto e delle diverse componenti.

La pompa aspira l'acqua dalla vasca del filtro biologico e la spinge all'unità di sterilizzazione a raggi UV per poi raggiungere la vasca passando attraverso la bocchetta di ossigenazione. La vasca comunica con il vano dotato di filtro in lana-perlon e di filtro carbone. Da qui l'acqua passa alla vasca con filtro biologico (alga *L. calcareum*) con cui entra a contatto dopo aver attraversato l'alloggio della serpentina di raffreddamento (l'ozonizzazione avviene nel medesimo alloggio). Quindi l'acqua viene aspirata dalla pompa e rimessa in circolo. Dal termostato si controlla la regolare temperatura dell'acqua.

Gli organismi sono stati posizionati, in monostrato, su una griglia di materiale plastico, in modo da evitare il contatto con il fondo della vasca e quindi minimizzare la ricontaminazione (Figura 6).



Figura 3
Contaminazione di organismi di *Mytilus galloprovincialis*

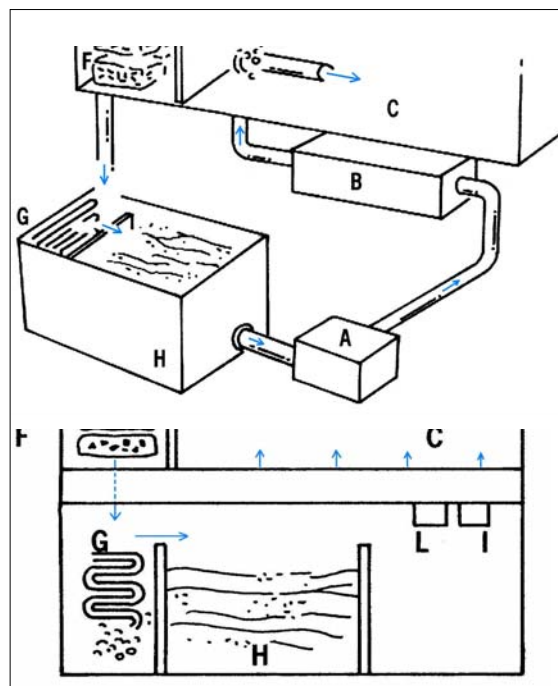


Figura 4
Impianto di depurazione utilizzato nella sperimentazione

I parametri chimico-fisici (temperatura, salinità, ossigeno disciolto) dell'acqua presente negli acquari sono stati routinariamente controllati.

Prelievo dei campioni

Campioni di acqua sono stati prelevati ogni 24 ore per controllare la funzionalità del sistema di depurazione. Campioni di molluschi sono stati prelevati prima dell'immissione in vasca di depurazione e



- A) Pompa
- B) Impianto di sterilizzazione a raggi UV
- C) Vasca
- D) Bocchetta di ossigenazione
- E) Filtro in lana-perlon
- F) Filtro-carbone
- G) Serpentina/unità di raffreddamento
- H) Filtro biologico
- I) Pompa dell'aria per l'ozonizzatore
- L) Ozonizzatore

Figura 5
Schema dell' impianto di depurazione



Figura 6
Organismi di *Mytilus galloprovincialis* in fase di depurazione

quindi ogni 6-12 ore dall'immissione in vasca, al fine di determinare l'andamento della carica depurazione atti alla commercializzazione dei prodotti. I campioni sono stati immediatamente processati secondo le metodiche di seguito riportate.

Conteggio di *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Vibrio parahaemolyticus* nei molluschi e nell'acqua

Molluschi

Per la ricerca e numerazione di *E. coli* nei molluschi è stata applicata la tecnica della coltura in un terreno liquido contenente cromogeno (5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide) ed il calcolo del numero più probabile (*most probable number*: mpn), dopo incubazione sia a 37°C che a 44°C (6). Per la ricerca e numerazione di *Salmonella* spp. in mpn nei molluschi è stata applicata la procedura riportata in FDA *Bacteriological analytical manual* (3). Per la ricerca e numerazione di *V. parahaemolyticus* in mpn è stato applicato il metodo interno che utilizza l'arricchimento in acqua peptonata alcalina, le subcolture a 6-8 ore, la semina in terreno selettivo (TCBS) e le conferme biochimiche singole e con sistemi miniaturizzati (API 20E/API 20NE).

Acqua

Per la ricerca e numerazione di *Salmonella* spp. e di *E. coli* nell'acqua sono state seguite rispettivamente le indicazioni riportate in ISO 6340/1995 (5) e IRSA-CNR Metodi analitici per le acque (7).

Risultati

Esame batteriologico degli organismi utilizzati nella sperimentazione

Le analisi degli esemplari prelevati nei siti di campionamento hanno sempre evidenziato bassi valori di *E. coli* (<230 mpn/100 g). In tutti i campioni esaminati, *S. Typhimurium* e *V. parahaemolyticus* sono risultati essere assenti.

Sperimentazione con *Escherichia coli*

Le prove sperimentali effettuate con *E. coli* hanno evidenziato tempi diversi di depurazione delle vongole a seconda del grado di contaminazione iniziale degli organismi. Durante le prove 1 e 2 è stata effettuata la depurazione di campioni che simulano la provenienza da zone C (*E. coli* <46.000 mpn/100 g, Tabella I), mentre nella prova 3 la depurazione di campioni da zone B (cariche di *E. coli* <4.600 mpn/100 g). Sulla base dell'andamento temporale relativo all'abbattimento della carica (in termini assoluti e percentuali; Tabella I e Figura 7), in tutte e tre le sperimentazioni è stata rilevata una considerevole riduzione della carica batterica (compresa tra 90-99%). Valori di *E. coli* <230 mpn/100 gr sono stati riscontrati dopo 48-60 ore in campioni che simulavano la provenienza da zone C, mentre dopo 24 ore in campioni da zone B. Tali livelli, che rendono il prodotto commercializzabile, si sono mantenuti pressoché costanti sino alla fine della sperimentazione, dimostrando l'efficacia del processo di depurazione e la possibilità di commercializzare il prodotto ancora fresco.

I risultati ottenuti dalla sperimentazione con i mitili hanno mostrato che le cariche di *E. coli* sono inferiori a 230 mpn/100 gr dopo sole 6-12 ore di depurazione. Tali organismi hanno evidenziato quindi una maggiore capacità di depurazione delle vongole. Inoltre dopo 48 ore di depurazione la percentuale di abbattimento della carica è stata pari al 99.5%.

Sperimentazione con *Salmonella Typhimurium*

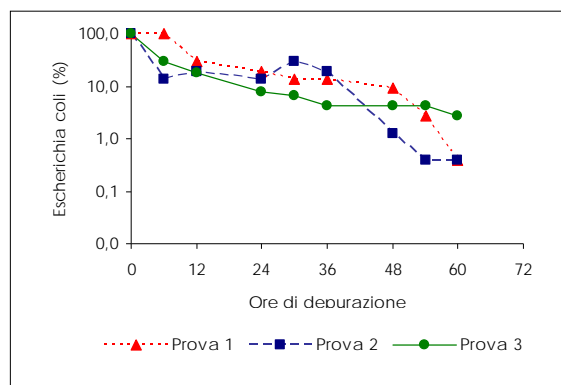
Le prove sperimentali effettuate con *S. Typhimurium* hanno simulato la depurazione di campioni di vongole con cariche

Tabella I
Effetto della depurazione sui molluschi contaminati con *Escherichia coli*

Ore di depurazione	Prova 1 ^(a)	<i>Escherichia coli</i>			Prova 1 ^(a) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (mpn/100 gr)
		Prova 2 ^(a, b) <i>Chamelea gallina</i> (mpn/100 gr)	Prova 3 ^(a)		
0	18 000	18 000	1 700	3 500	
6	18 000	2 400	490	230	
12	5 400	3 500	310	220	
24	3 500	2 400	130	130	
30	2 400	5 400	110	68	
36	2 400	3 500	70	68	
48	1 700	220	70	<18	
54	500	70	70	<18	
60	70	70	45	<18	

a) carica inoculata nella vasca di contaminazione: $1,87 \cdot 10^4$ /ml
b) carica inoculata nella vasca di contaminazione: $3,75 \cdot 10^4$ /ml

A) Sperimentazione con le vongole



B) Sperimentazione con i mitili

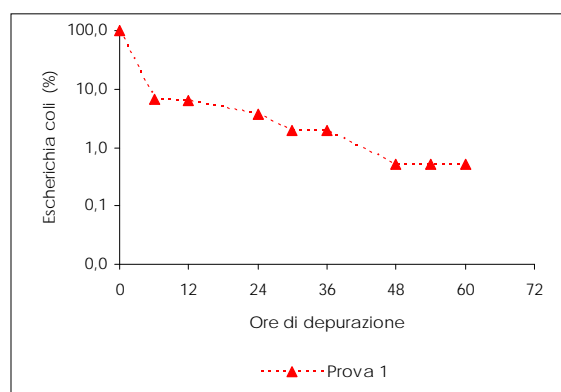


Figura 7
Variazione della carica batterica di *Escherichia coli* in termini percentuali rispetto ai valori iniziali, durante la sperimentazione con le vongole e i mitili

batteriche di partenza comprese tra 430 e 930 mpn/g. Sulla base dell'andamento temporale

relativo all'abbattimento della carica (in termini assoluti e percentuali) (Tabella II e Figura 8), è possibile dedurre che dopo 72-84 ore di depurazione gli organismi sono privi di *Salmonella*. La riduzione della carica in termini percentuali è stato pari al 99.9%.

I risultati ottenuti dalla sperimentazione con i mitili hanno mostrato che le cariche di *S. Typhimurium* sono inferiori a 0.3 mpn/gr dopo 24-36 ore di depurazione. Dopo 48 ore di depurazione, partendo da cariche pari a 230 mpn/g, è stata rilevata una percentuale di abbattimento della carica pari al 99.9%.

Sperimentazione con *Vibrio parahaemolyticus*

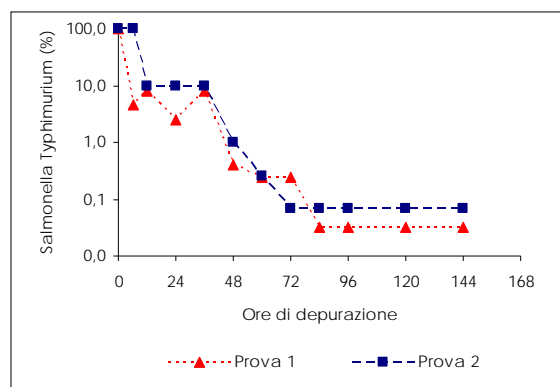
Le prove sperimentali effettuate con *V. parahaemolyticus* hanno simulato la depurazione di campioni con cariche batteriche di partenza comprese tra 2.400 e 9.000 mpn/100 g (Tabella III). I risultati ottenuti dalle sperimentazioni con le vongole hanno mostrato una scarsa diminuzione della carica batterica durante tutto il periodo di osservazione. Nelle prove 1 e 2 è stato rilevato un abbattimento della carica in termini percentuali pari al 75% ca. dopo 24 ore (Figura 9A). Tali valori si sono mantenuti pressoché costanti durante tutto il successivo periodo di osservazione. Al contrario le sperimentazioni con i mitili hanno mostrato valori inferiori a 0.3 mpn 100/g dopo 36-48 ore di depurazione. Tali valori si sono mantenuti

Tabella II
Effetto della depurazione sui molluschi contaminati con *Salmonella* Typhimurium

Ore di depurazione	<i>Salmonella</i> Typhimurium			
	Prova 1 ^(a) <i>Chamelea gallina</i> (mpn/gr)	Prova 2 ^(b)	Prova 1 ^(a) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (mpn/gr)	Prova 2 ^(b)
0	930	430	230	230
6	43	430	230	430
12	75	43	9.3	46
24	23	43	2.3	<0.3
36	75	43	<0.3	<0.3
48	3.8	4.3	<0.3	<0.3
60	2.3	1.1	<0.3	<0.3
72	2.3	<0.3	<0.3	<0.3
84	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
96	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
120	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3
144	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3

a) carica inoculata nella vasca di contaminazione: $9,37 \cdot 10^3$ /ml
b) carica inoculata nella vasca di contaminazione: $1,87 \cdot 10^4$ /ml

A) Sperimentazione con le vongole



B) Sperimentazione con i mitili

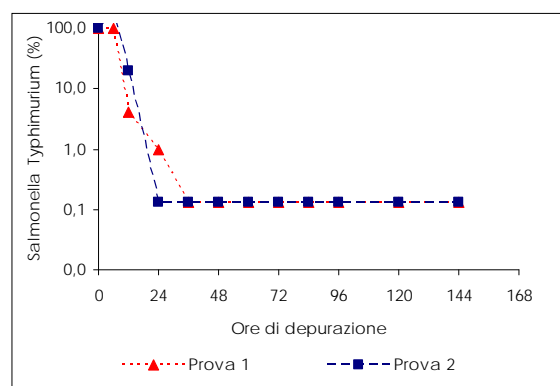


Figura 8
Variazione della carica batterica di *Salmonella* Typhimurium in termini percentuali rispetto ai valori iniziali, durante la sperimentazione con le vongole e i mitili

pressoché costanti durante tutto il successivo periodo di osservazione. In termini percentuali dopo 36-48 ore l'abbattimento è risultato essere compreso tra 99.5% e 99.9% ca. (Figura 9B).

Mortalità degli organismi durante le sperimentazioni

Nel corso di tutte le prove effettuate è stata riscontrata una mortalità nulla o prossima allo zero.

Funzionamento del circuito

I valori relativi a salinità, temperatura ed ossigeno hanno mostrato variazioni minime:

- salinità pari a 36 ± 1 ‰
- temperatura pari a 14 ± 1 °C
- ossigeno disciolto pari a 8 ppm.

Tutti i campioni di acqua prelevati nel circuito di depurazione hanno rilevato l'assenza di patogeni. Tale dato ha evidenziato un elevato grado di efficienza nella depurazione dell'acqua messa in ricircolo.

Discussione

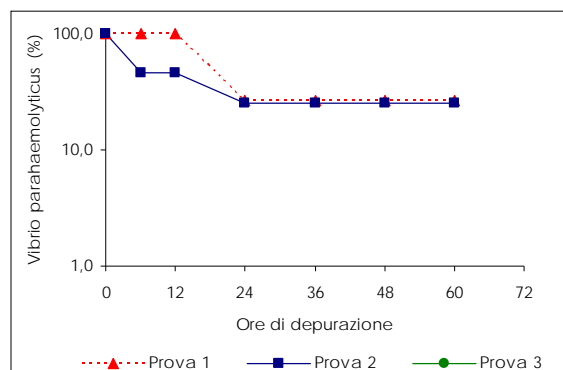
Le sperimentazioni condotte hanno permesso di evidenziare marcate differenze nell'efficacia dei processi di depurazione al variare dei microrganismi patogeni considerati. Ulteriori differenze sono state rilevate confrontando le

Tabella III
Effetto della depurazione sui molluschi contaminati con *Vibrio parahaemolyticus*

Ore di depurazione	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>					
	Prova 1 ^(a)	Prova 2 ^(b) <i>Chamelea gallina</i> (mpn/100 gr)	Prova 3 ^(c)	Prova 1 ^(a)	Prova 2 ^(b) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (mpn/100 gr)	Prova 3 ^(c)
0	9 000	5 200	2 400	5 400	5 400	2 400
6	9 000	2 400	2 400	230	230	2 100
12	9 000	2 400	2 200	92	110	230
24	2 400	1 300	2 200	30	92	36
36	2 400	1 300	2 200	<0.3	230	30
48	2 400	1 300	2 200	<0.3	<0.3	<0.3
60	2 400	1 300	2 200	<0.3	<0.3	<0.3

a) carica inoculata nella vasca di contaminazione: $9,37 \cdot 10^3$ /ml
 b) carica inoculata nella vasca di contaminazione: $1,87 \cdot 10^4$ /ml
 c) I carica inoculata nella vasca di contaminazione: $3,75 \cdot 10^4$ /ml

A) Sperimentazione con le vongole



B) Sperimentazione con i mitili

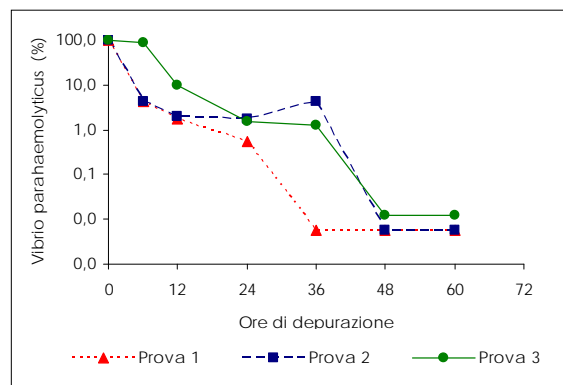


Figura 9
Variazione della carica batterica di *Vibrio parahaemolyticus* in termini percentuali rispetto ai valori iniziali, durante la sperimentazione con le vongole e i mitili

prove effettuate con le vongole e quelle effettuate con i mitili.

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione con *E. coli* mostrano che la specie

C. gallina è depurabile. Tuttavia, i tempi possono variare significativamente in funzione del grado di contaminazione iniziale. Infatti, vongole provenienti da zone B abbattano rapidamente la carica, raggiungendo dopo 24 ore di depurazione i valori consentiti dalla normativa vigente per la commercializzazione (*E. coli* ≤ 230 mpn/100 g), mentre vongole provenienti da zone C necessitano di tempi 2-3 volte maggiori. Di conseguenza, nel caso di vongole provenienti da zone B, gli stabilimenti di depurazione potrebbero utilizzare tempi brevi ed economicamente più vantaggiosi. Al contrario, con organismi provenienti da zone C, il protrarsi del periodo di depurazione determinerebbe un maggior dispendio economico. E' pertanto confermato per quest'ultimi organismi l'utilità del trattamento richiesto dalla normativa vigente che consiste in una lunga depurazione (≥ 2 mesi) in zone classificate ai fini della stabulazione.

È tuttavia necessario rimarcare che i tempi di depurazione riscontrati in questo studio sono strettamente dipendenti dalle caratteristiche del sistema utilizzato. Tale sistema, infatti, è un sistema chiuso, che opera con acqua i cui parametri chimico-fisici sono sottoposti a controllo costante. Inoltre gli organismi sono stati disposti in modo da avere una bassa densità rispetto a quelli comunemente contenuti nei bins dei centri di depurazione molluschi. Le ottime condizioni di permanenza degli organismi all'interno dei sistemi di

depurazione sono rimarcate dai bassi valori di mortalità riscontrati..

L'influenza dei parametri chimico-fisici dell'acqua di depurazione sulla vitalità degli organismi appartenenti alla specie *C. gallina* è stata evidenziata anche in precedenti studi. Serratore *et al.* (16) riportano che dopo 24 ore di depurazione, i valori di mortalità sono pari a zero negli impianti a circuito chiuso, mentre del 15.5% in quelli a circuito aperto.

In riferimento alle prove di depurazione con *S.typhimurium*, le vongole hanno mostrato tempi di depurazione lunghi con valori assimilabili alla assenza di *Salmonella* dopo 72-84 ore. Diversi autori riportano che la depurazione di *Salmonella* spp. richiede tempi maggiori rispetto a quella di *E. coli* (8, 17). Alcuni autori hanno ipotizzato che tale differenza possa essere spiegata considerando i parametri chimico-fisici dell'acqua di depurazione (15), tuttavia nelle sperimentazioni effettuate tali parametri sono stati controllati.

Di particolare rilevanza risulta essere il comportamento delle vongole in presenza di *V. parahaemolyticus*. Gli organismi sottoposti ai processi di depurazione sembrerebbero rilasciare una bassa quantità di carica batterica, la presenza del patogeno potrebbe quindi influenzare le capacità di filtrazione rallentandole. Infatti, confrontando le prove effettuate con cariche di partenza paragonabili di *V. parahaemolyticus* ed *E. coli* (rispettivamente, 1.200 e 1.700 mpn/100 g), risulta evidente che le vongole, in presenza di *E. coli*, sono capaci di depurarsi in tempi brevi, mostrando una riduzione della carica batterica del 95% ca. dopo 24 ore, al contrario di quanto avviene in presenza di *V. parahaemolyticus*.

Tali osservazioni si riscontrano anche in altri organismi bivalvi. Molluschi appartenenti alla specie *Crassostrea virginica* mostrano tempi di depurazione maggiori per *Vibrio* spp. che per *E. coli* e *S. Tallahassee* (10). Di contro, nelle sperimentazioni condotte con i mitili, questi si sono mostrati essere più sensibili al trattamento di depurazione, risultando non più contaminati da *V. parahaemolyticus* dopo 36-48 ore.

Dato che la velocità a cui *E. coli* viene rilasciato dalle vongole è marcatamente differente da quella di *V. parahaemolyticus*, la diminuzione nel numero di *E. coli* non può essere usata per estrapolare la diminuzione del numero di vibroni. Questo dato mostra che *E. coli* è un indice microbiologico inadeguato per la salubrità dei molluschi, non solo perché non è correlato con la presenza in ambienti naturali dei vibroni (14), ma anche perché non è in grado di attestare la capacità di depurazione di una specie. È inoltre evidente che mentre il rischio da contaminazione fecale può essere ridotto prelevando i molluschi da aree non contaminate da reflui urbani, nel caso dei vibroni, naturalmente presenti nell'acqua di mare, devono essere attuate misure preventive diverse. I risultati presentati in questa ricerca avvalorano quanto dimostrato in precedenti studi, rimarcando che livelli alti, medi e bassi di *V. parahaemolyticus* potrebbero costituire una minaccia per la sanità pubblica (4, 18). Mead *et al.* (9) hanno evidenziato come le infezioni dovute al genere *Vibrio* abbiano costituito una delle maggiori cause di epidemie legate al consumo di bivalvi. Sondaggi riferiti alle patologie riscontrate negli Stati Uniti negli anni 1997-1998 riportano che la mortalità associata alle infezioni da Vibrionaceae era 10 volte maggiore di quelle da *Salmonella* ed *E. coli*.

Conclusioni

Il seguente lavoro sperimentale dimostra che la vongola (*C. gallina*) è una specie depurabile da *E. coli* e questo dato rimane di conforto in questi anni in cui gli areali di pesca di questa specie, solitamente di classe A, a causa dei cambiamenti climatici con forti eventi alluvionali, subiscono pesanti contaminazioni da acque dolci fluviali, con un declassamento alla categoria di tipo B. Riguardo la presenza di altri germi quali la *Salmonella* e *V. parahaemolyticus*, si conferma la necessità di più lunghi periodi di depurazione. Mentre per *Salmonella* rimane comunque la sicurezza per il consumatore che se un'area di produzione risulta contaminata, la raccolta viene vietata fino alla negativizzazione dell'area, agendo sulle fonti di contaminazione, così non è per

V. parahaemolyticus. Per questo batterio, alofilo autoctono, normale componente della flora del mollusco, le attuali normative non prevedono alcuna restrizione anche per la mancanza di dati riguardo la dose infettante l'uomo e

procedure di analisi affidabili. Per ora l'unico modo per tutelare la salute del consumatore da contaminazione di *V. parahaemolyticus* è consigliare il consumo di molluschi cotti.

Bibliografia

1. Commissione delle Comunità Europee (CE) 2005. Regolamento (CE) N. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazz Uff*, **L 338**, del 22/12/2005, 1-26 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:it:PDF ultimo accesso il 27 novembre 2009).
2. Croci L. & Suffredini E. 2003. Rischio microbiologico associato al consumo di prodotti ittici. *Ann Ist Super Sanità*, **39** (1), 35-45 (dspace.iss.it/dspace/bitstream/2198/-25870/1/ISSA03_0021-2571_2003_S_39_01_35-45.pdf ultimo accesso il 27 novembre 2009).
3. Food and Drug Administration (FDA) 1998. FDA Bacteriological analytical manual, 8th Ed. (Revision A/1998). FDA, Washington, DC, Chapter 5 (www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm ultimo accesso 27 novembre 2009).
4. Gugnani H.C. 1999. Some emerging food and water borne pathogens. *J Commun Dis*, **31**, 65-72.
5. International Organization for Standardization (ISO) 1995. ISO 6340/1995: Water quality –detection and enumeration of *Salmonella*. ISO, Geneva, 11 pp.
6. International Organization for Standardization (ISO) 2005. ISO/TS 16649-3:2005: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. ISO, Geneva, 8 pp.
7. Istituto di Ricerca sulle Acque (IRSA)-Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) 2003. IRSA-CNR, APAT-Manuale e Linee Guida 29/2003, Metodi analitici per le acque – 7020 Metodo B. IRSA-CNR, Roma, 823-894, 927-934.
8. Martinez-Manzanares E., Egea F., Castro D., Morinigo M.A., Romero P. & Borrego J.J. 1991. Accumulation and depuration of pathogenic and indicator microorganisms by the bivalve mollusc, *Chamelea gallina*, under controlled laboratory conditions. *J Food Prot*, **54**, 612-618.
9. Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M. & Tauxe R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, **5**, 607-625.
10. Murphree R.L. & Tamplin M.L. 1991. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* O1 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 3656-3660.
11. Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione Europea (CE) 2004. Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari. *Gazz Uff*, **L 139**, 30/04/2004, 1-54 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:it:pdf ultimo accesso il 27 novembre 2009).
12. Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione Europea (CE) 2004. Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. *Gazz Uff*, **L 139**, 30/04/2004, 55-205 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:it:pdf ultimo accesso el 27 novembre 2009).
13. Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione Europea (CE) 2004. Regolamento (CE) N. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano. *Gazz Uff*, **L 139**, 30/4/2004, 206-320 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0206:0320:it:pdf ultimo accesso el 27 novembre 2009).
14. Ripabelli G., Grasso G.M., Sammarco M.L. & Luzzi I. 1997. Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica. Istituto Superiore di Sanità (ISTISAN), Roma, Rapporti ISTISAN 97/31, 55 pp.
15. Rowse A.J. & Fleet G.H. 1984. Effects of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella* *charity* and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*). *Appl Environ Microbiol*, **48**, 1061-1063.

16. Serratore P., Squintani G., Giuliani G., Paesanti F., Milandri S., Rey A. & Selvatico L. 2000. La depurazione di *Chamelea gallina*. *Il Pesce*, April.
17. Timoney J.F. & Abston A. 1984. Accumulation and elimination of *E. coli* and *S. typhimurium* by hard clams in an *in vitro* system. *Appl Environ Microbiol*, **47**, 986-988.
18. Weise E. 2001. Spread of zoonotic agents by foods of animal origin. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **108**, 344-347.