

MONITORAGGIO SANITARIO DI *PROCAMBARUS CLARKII*
(GIRARD 1852) NEL LAGO DI MASSACIUCCOLI; PATOLOGIA
RISCONTRATA IN RELAZIONE A CARICA MICROBICA
DELL'ACQUA E CONDIZIONI AMBIENTALI

SANITARY CONTROL OF *PROCAMBARUS CLARKII* POPULATION
(GIRARD 1852) LIVING IN MASSACIUCCOLI LAKE; ENCOUNTERED
PATHOLOGY IN RELATION TO WATER MICROBIAL CHARGE
AND ENVIRONMENTAL CONDITIONS

GIACOMO ROSSI ⁽³⁾, SILVIA PEDRAZZI ⁽¹⁾,
ANNALaura CARDUCCI ⁽²⁾, ALESSIA GIUNTINI ⁽²⁾, FABIO MAZZI ⁽¹⁾,
FRANCO VERNI ⁽⁴⁾, PAOLO MANI ⁽³⁾

RIASSUNTO

Lo stato sanitario di *P. clarkii* nel lago di Massaciuccoli è stato rilevato da un campione di 3281 gamberi catturati in quattro distinte zone, nel corso di 8 prelievi effettuati da maggio 2000 a gennaio 2001: oltre ai gamberi sono stati prelevati campioni di acqua per analisi microbiologiche. Alla cattura sono stati raccolti i dati relativi a mortalità e presenza di lesioni macroscopiche esterne ed in laboratorio sono stati effettuati controlli istologici su lesioni all'esoscheletro e/o ad organi interni e controlli batteriologici su branchie, contenuto intestinale e campioni di acqua. La mortalità è risultata del 3,66% (120 gamberi morti su 3281 esaminati) e le lesioni all'esoscheletro sono risultate di natura traumatica, spesso complicate da processi flogistici sostenuti da *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. Sono state rilevate anche lesioni primarie sostenute da batteri chitinolitici. Da intestino e branchie sono stati isolati batteri appartenenti ai generi *Citrobacter*, *Proteus* e *Vibrio*. La carica microbica dell'acqua è risultata diversa nelle zone e nel tempo in relazione a condizioni climatiche ed ambientali.

Parole chiave: *Procambarus clarkii*, monitoraggio igienico-sanitario, patologia.

SUMMARY

The sanitary status of *P. clarkii* population, living in Massaciuccoli lake, was been evaluated, examining 3281 crayfishes captured from May 2000 to January 2001 in four different zones. Living crayfish and specimens of water for microbiological tests were been sampled eight times during the study. Different parameters were considered as:

⁽¹⁾ Biologo, Collaboratore esterno.

⁽²⁾ Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche, Infettivologia ed Epidemiologia.

⁽³⁾ Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi e Igiene degli Alimenti.

⁽⁴⁾ Dipartimento di Etologia, Ecologia ed Evoluzione.

mortality of crayfishes during the capture, typology of exoschelethral and visceral lesions, evaluation of the different species of bacteria isolated from sampled crayfishes and water. An histopathological study was been performed from encountered exoschelethral and visceral lesions. Finally, all parameters were compared with total microbial charge resulted from the examination of water samples. Mortality during the capture resulted of 3.66% (120 dead crayfishes / 3281 examined crayfishes) and exoschelethral lesions examination revealed the traumatic and primary microbial nature of them. Particularly, crayfish's aetiology of external lesions resulted the infection with *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp., *Citrobacter*, *Proteus* and *Vibrio* which were isolated from gills and gut of crayfishes. The mortality at the capture and the prevalence of primary exoschelethral lesions resulted depending from the microbial charge of the water, that changed in different zones and times during the sampling in relation to environmental and climatic conditions.

Key words: *Procambarus clarkii*, sanitary control, pathology.

INTRODUZIONE

La recente introduzione di *Procambarus clarkii* (Girard 1852) o Gambero rosso della Louisiana nel lago di Massaciuccoli ha determinato, a causa della notevole adattabilità di questa specie alloctona, un impatto sulla struttura biocenotica dell'area, con conseguenze non ancora ben valutate.

La specie è infatti poco o nulla sensibile alla maggior parte delle patologie che colpiscono i gamberi e che, secondo Vogt (1999), possono essere distinte, in quattro categorie: malattie che non provocano danni visibili all'ospite (es. psorospermiasi), malattie che risultano letali per gli individui infetti, ma che non provocano particolari danni a livello di popolazione per la bassa prevalenza del patogeno (es. malattia della porcellana), malattie in grado distruggere le popolazioni infette (es. peste del gambero) e malattie che comportano perdita economica poiché rendono l'animale non commerciabile (es. "burn spot").

Per contenere la popolazione, in costante aumento, è stata autorizzata la pesca dei gamberi tramite nasse ed è stata la segnalazione del rinvenimento di gamberi morti al momento della cattura a suggerire, in un primo tempo, controlli preliminari su gamberi morti. In un secondo momento, sono stati effettuati controlli mirati su soggetti catturati in diverse zone e per un certo periodo di tempo, allo scopo di valutare lo stato sanitario di *P. clarkii* nel lago di Massaciuccoli in

relazione alle condizioni ambientali stagionali ed alla carica microbica dell'acqua nelle diverse zone di cattura.

MATERIALI E METODI

I campionamenti di animali e di acqua sono stati effettuati nel periodo 29 maggio-13 ottobre dell'anno 2000, nel corso di 7 interventi in quattro aree distinte del lago, denominate:

- 1) *Punta grande vecchia*, 2) *Fosso Le Venti*, 3) *Canale Malfante*, 4) *Zona idrovora*.

Ad ogni prelievo sono stati contati separatamente: i gamberi catturati, quelli rinvenuti morti e quelli che presentavano lesioni esterne.

Il campione di *Procambarus clarkii* destinato agli esami di laboratorio era costituito, per ciascuna delle 4 zone di cattura, da 20 individui: 7 maschi adulti, 7 femmine adulte e 6 giovani. Ogni gambero veniva sottoposto a:

- esame necroscopico e successivi controlli al microscopio stereoscopico e ottico per osservare e classificare le lesioni all'esoscheletro e ad organi interni;
- esame parassitologico, su branchie e intestino, sia tramite osservazione a fresco, che mediante tecnica per flottazione in soluzione sovrasatura di NaCl;
- controllo batteriologico da branchie e contenuto dell'intestino, effettuato eseguendo un prelievo degli organi che erano omogenati in peptonata sterile ed incubati a 21 e 37°C per 24 h. Successivamente un'ansata di supernatante veniva seminata su terreno Brillant Green Agar (BGA, Oxoid) e Salmonella Shigella agar (SS, Oxoid) nonché Agar desossicolato (Oxoid). Tramite tampone sterile si procedeva anche alla semina di una piccola quantità di supernatante incubato a 21°C, nei terreni agarizzati specifici per *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp. quali il Marine Agar (MA Oxoid) e Pseudomonas agar, incubati a 21°C per 24-48 h. Le colonie venivano identificate mediante tests biochimici (API 20E, API 20 NE, Biomerieux). Le colonie cresciute su Marine Agar, venivano sospese in 5 ml di una soluzione salina allo 0,85% ed inoculate negli appositi pozzeti, per l'identificazione del genere *Vibrio*;

- controllo istologico su organi interni e su lesioni dell'esoscheletro. Veniva effettuato fissando il materiale in formalina tamponata al 10% e successivamente, dopo disidratazione nella serie ascendente degli alcoli, veniva incluso in paraffina. Le sezioni istologiche venivano colorate con ematossilina-eosina, Giemsa, Gram, colorazione policroma di Herovici, impregnazione argenticca, e con metodo all'acido periodico di Schiff (PAS).

Sono stati ricercati gli indicatori batterici di inquinamento fecale: coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali mediante il metodo del Most Probable Number (MNP). Inoltre sono state valutate, con il metodo della conta diretta, la carica batterica totale sia a 22° che a 37°C e la presenza/assenza di spore di clostridi solfito-riduttori (Avio e coll., 1980).

RISULTATI

Complessivamente, nel corso dei 7 campionamenti, sono stati catturati ed esaminati sul posto 3281 gamberi. Fra questi 120 sono stati rinvenuti morti nelle nasse al momento della cattura.

Differenze statisticamente significative nel tasso di mortalità ($p < 0,05$) sono state osservate tra le differenti aree e date di campionamento come si evince dalla Tabella I.

Tab. I. Andamento della mortalità in relazione alle stazioni e ai periodi di campionamento (analisi con il test χ^2).

Zone	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Totale
29 maggio	42 (35%) b	3 (2%) a	2 (1,07%) a	5 (2,60%) a	52 (8,01%) b
14 giugno	11 (5,31%) b	3 (1,62%) a	3 (1,47%) a	1 (0,78%) a	18 (2,49%) a
03 luglio	9 (5,20%) b	2 (0,95%) a	4 (1,86%) a	2 (1,21%) a	17 (2,23%) a
20 luglio	9 (4,97%)	3 (1,48%)	5 (2,63%)	2 (1,48%)	19 (2,68%) a
13 settembre	1 (2,32%)	0 (0%)	1 (1,75%)	2 (8%)	4 (2,35%) a
29 settembre	0 (0%)	1 (3,70%)	0 (0%)	3 (10%)	4 (3,03%) c
13 ottobre	1 (2,32%)	0(0%)	1(3,57%)	1(2,77%)	6(4,31%) b
Totale	76 (9,59%) b	12 (1,41%) a	16 (1,72%) a	16 (2,26%) a	120 (3,66%)

Si nota infatti che i valori più alti di mortalità si sono registrati nella zona di prelievo n° 1 solamente per quanto attiene i campionamenti effettuati nel periodo maggio-luglio, mentre nel periodo luglio-ottobre i valori della mortalità tendono ad uniformarsi per tutte e quattro le stazioni di prelievo. Parimenti, anche i livelli di contaminazione microbica delle acque, soprattutto per quanto attiene i coliformi fecali, risultano differire in modo significativo ($p < 0,05$) tra le zone come riportato in Tabella II.

Tab II. Confronto tra le medie logaritmiche dei coliformi totali, fecali, streptococchi fecali, carica batterica totale a 22°C e 37°C per le diverse zone.

	Zona 1		Zona 2		Zona 3		Zona 4		p*
	Media	ds	Media	ds	Media	ds	Media	ds	
C. totali	2,74	0,746	2,28	0,344	2,31	0,390	2,78	0,638	n.s.
C. fecali	1,86 b	0,453	1,51 ab	0,716	0,75 a	0,888	2,11 b	0,800	s(<=
S. fecali	2	1,002	2,08	0,654	1,8	1,003	2,22	0,278	n.s.
C.B. 22°	2,98	0,411	2,83	0,360	2,9	0,257	2,97	0,274	n.s.
C.B. 37°	2,9	0,276	2,7	0,153	2,65	0,224	2,85	0,269	n.s.

Per quanto attiene le lesioni riscontrate sui gamberi esaminati, queste sono state classificate in tre gruppi: di tipo traumatico alle chele, di tipo traumatico all'esoscheletro e di tipo primitivo. Mentre dai primi due tipi di lesione è stato possibile isolare batteri contaminanti, spesso in associazione a processi flogistici in atto evidenziati dalla colorazione nerastra dell'esoscheletro per accumulo di cellule melanomacrofagiche (Fig. 1), dalle lesioni di tipo primitivo, a stampo ulcerativo, sono stati costantemente isolati batteri chitinolitici appartenenti alle specie *Pseudomonas aeruginosa* e *fluorescens* ed *Aeromonas hydrophyla*

L'esame istologico delle lesioni esoscheletriche primitive ha fornito importanti elementi patogenetici del processo ulcerativo indotto dai batteri chitinoclastici. In particolare è stata documentata la fase iniziale di aderenza dei batteri all'esoscheletro (Fig. 2) accompagnata da fenomeni di rigonfiamento e degenerazione della struttura lamellare di quest'ultimo, seguita da erosione epicuticolare (Fig. 3) e da approfondimento dell'ulcera negli strati sottostanti (Fig. 4).

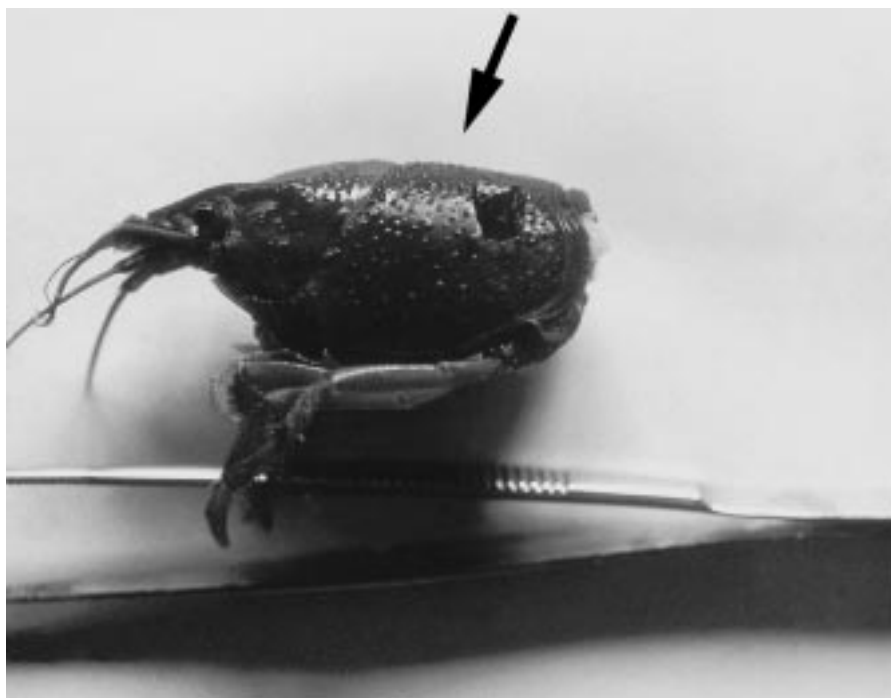


Fig. 1. Cefalotorace di gambero mancante di chele, con lesione traumatica in corrispondenza delle camere branchiali.

Dall'esame microbiologico dei pool di organi sono state isolate molteplici specie batteriche appartenenti ai generi *Escherichia* (60,7%), *Citrobacter* (17,86%), *Proteus* (46,4%), *Plesiomonas* (3,57%), *Vibrio* (10,7%), *Stenophyla* (3,57%). In particolare sono state osservate, all'esame istologico, lesioni di tipo necrotico epato-pancreatiche in concomitanza all'isolamento di *Citrobacter freundii* e *Proteus* spp. mentre nessuna lesione macro o microscopica è stata osservata in associazione con l'isolamento di *Vibrio anguillarum*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Plesiomonas shigelloides*.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il controllo microbiologico delle acque ha evidenziato che le 4 stazioni sono fortemente inquinate da batteri di diversa provenienza anche se la stazione 3, in prossimità del Canale Malfante, presenta un livello

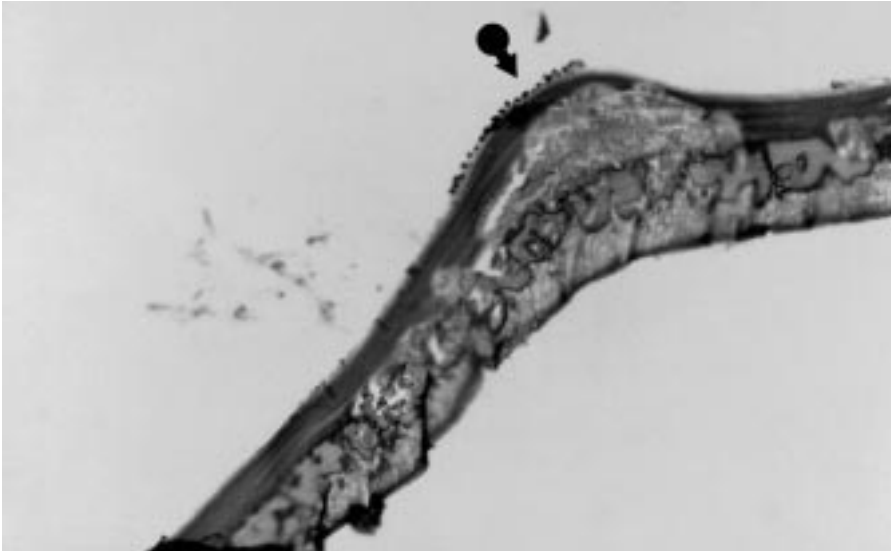


Fig. 2. Aspetto iniziale di lesione ulcerativa cuticolare: si nota la presenza di batteri (freccia) adesi a livello epicuticolare (E.E, 100X).

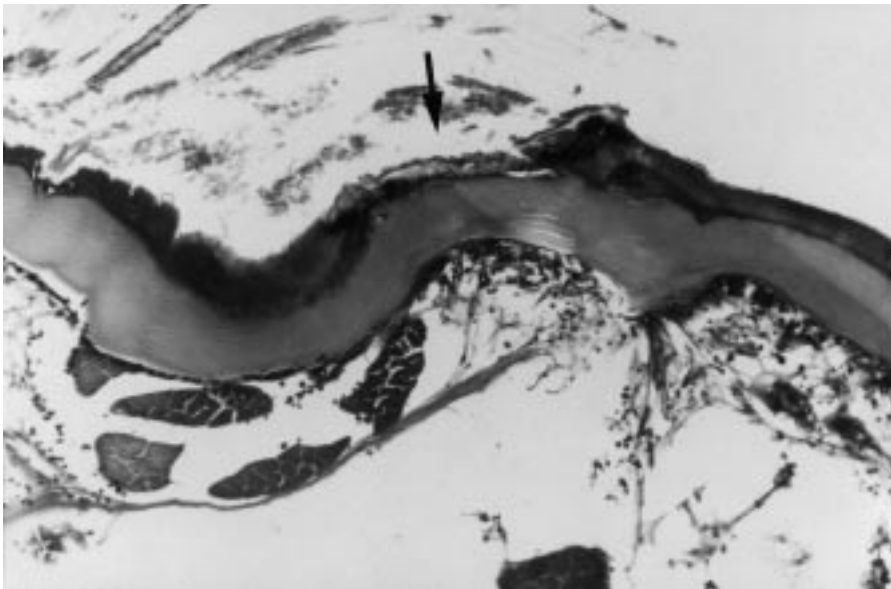


Fig. 3. Erosione dell'esoscheletro. Si notano fenomeni necrotici (freccia) che interessano l'epicuticola, in un'area in cui questa è quasi scomparsa (E.E, 100X).

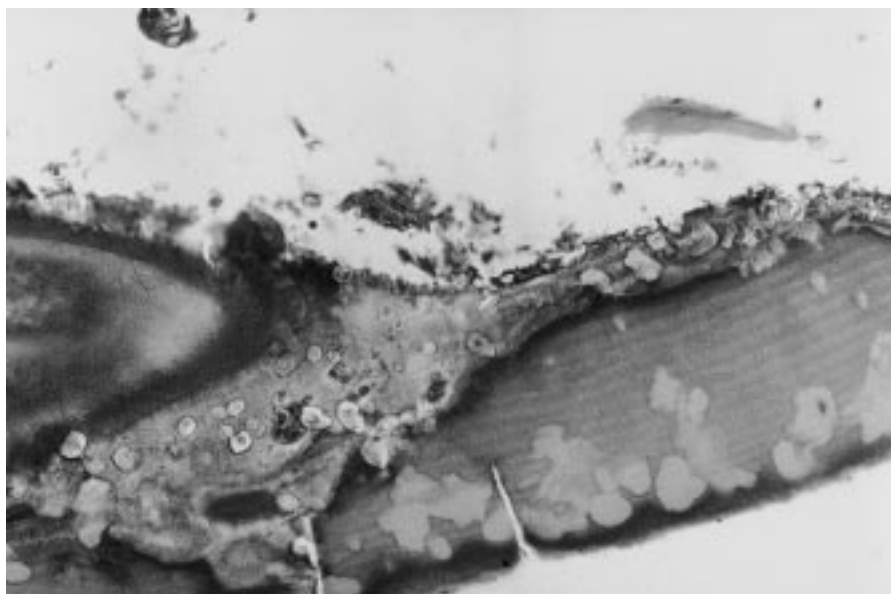


Fig. 4. Erosione dell'esoscheletro: il fenomeno necrotico, a partenza epicuticolare, si approfondisce negli strati sottostanti (E.E, 40X).

di inquinamento più modesto. Ciò può dipendere dalla diluizione dalle acque marine provenienti dal canale Burlamacca, emissario-immissario del lago. Al contrario le aree 1 e 4, risultano fortemente interessate da inquinamento di tipo urbano e di tipo agricolo confermati dagli alti valori di colimetria totale. Il fatto che si abbiano differenze statisticamente significative anche sulla prevalenza della mortalità al prelievo, associata al rinvenimento di lesioni esoscheletriche in funzione della zona di cattura, con valori più elevati proprio nella zona 1 che risulta anche la più inquinata, dimostra che *P. clarkii*, anche se specie molto rustica, risente delle variazioni ambientali. Le lesioni osservate negli esemplari esaminati sono state per lo più a carattere ulcerativo, come descritto anche da vari Autori sia in specie di gamberi di allevamento (Mancini, 1989) che in specie selvatiche (Aldermann & Polglase, 1988). Tali lesioni risultano caratterizzate macroscopicamente da fenomeni di melanizzazione periulcerosa e, istologicamente, da area necrotica centrale, spesso frammista a presenza di colonie batteriche. La melanizzazione periulcerosa può essere considerata come un tentativo di circoscrizione della lesione operato dall'ospite (Vogt, 1999). Ciò permette di ipotizzare, similmente a quanto avviene nei pesci, che

anche nel gambero vi siano popolazioni melanomacrofagiche che intervengono nei processi flogistici di tipo cronico provocati da noxae che stimolano la fagocitosi (Ghittino, 1985).

Per quanto attiene le specie batteriche isolate dagli organi di *P. clarkii*, di particolare interesse risulta l'isolamento di *Citrobacter* e *Proteus*. Per entrambi i generi infatti la letteratura riporta un potere patogeno per il gambero (Toumanoff, 1967a, Alderman & Polglase, 1988; Vey, 1981; Mancini 1989; Oidtmann e coll., 1999). Tra le specie batteriche isolate riveste un'importanza particolare il genere *Vibrio* per il fatto che non risulta essere causa di patologia nel gambero che può altresì risultare portatore asintomatico. Delle due specie isolate, *Vibrio anguillarum* risulta fortemente patogena per *Anguilla anguilla* in cui provoca lesioni esterne a carattere ulcerativo e forme setticemiche (Esteve & Garay, 1991) e per la carpa (Ransom e coll., 1984), mentre *Vibrio parahaemoliticus* può risultare causa di tossinfezioni alimentari nell'uomo (Reali e coll., 1977). Anche *Plesiomonas shigelloides*, da noi isolato in vari esemplari, è specie patogena per l'uomo, ripetutamente isolata da acque e organismi acquatici (Krovacek e coll., 2000). I dati relativi alla patologia riscontrata alla necroscopia e i risultati dei controlli istologici e batteriologici effettuati sugli organi interni, se valutati alla luce di quanto emerso dai dati relativi ai controlli microbiologici delle acque, evidenziano correlazione fra stato dell'ambiente e condizioni di salute di *P. clarkii*. La ricerca microbiologica delle acque evidenzia che una maggiore carica microbica ambientale, unitamente a condizioni climatologiche inidonee, favorisce le infezioni batteriche e l'insorgenza di lesioni causate all'esoscheletro da batteri ad azione chitinoclastica quali *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* e *Aeromonas hydrophyla* che, in condizioni di alterata omeostasi dei differenti strati esoscheletrici (soprattutto a carico epicuticolare) attaccano il gambero causando la formazione di ulcere e, nei casi più gravi, setticemia.

Infine, considerato che nel lago di Massaciuccoli *P. clarkii* è oggetto di pesca e di successiva commercializzazione nei mercati locali, non deve neppure essere sottovalutato il rischio di tossinfezioni alimentari in quanto portatore asintomatico di batteri dei generi *Vibrio* e *Plesiomonas*.

BIBLIOGRAFIA

- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. (1988). Pathogens, parasites and commensals. In Freshwater crayfish: biology, management and exploitation, pp. 167-212.
- AVIO C.M., CARDUCCI A., GRONCHI G., PETROLINI R. (1980). L'inquinamento batterico del fiume Arno correlato alla portata ed alle sue variazioni stagionali. Riv. It. Ig., 40: 224-237.
- ESTEVE C., GARAY E. (1991). Heterotrophic bacterial flora associated with european in *Anguilla anguilla* reared in freshwater. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 57 (7): 1369-1375.
- GHITTINO P. (1985). Tecnologie e patologie in acquacultura. Vol. 2: Patologia: pp. 203, Torino.
- KROVACEK K., ERIKSSON L.M., GONZALEZ- REY C., ROSINSKY J. & CIZNAR J. (2000). Isolation, biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in northern Europe. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 23 (1): 45-51.
- MANCINI A., MOSCONI G. (1989). Patologia dei gamberi di acqua dolce (Crustacea: Decapoda: Astacoidea, Parastacoidea). Obiettivi Veterinari, 14 (1): 13-20.
- OIDTMANN B., HOFFMANN R.W. (1999). Bacteriological investigations on crayfish. In Freshwater Crayfish, 12: 288-301.
- RANSOM D.P., LANNAN C.N., ROHOVEC J.S., FRYER J.L. (1984). Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. J. Fish Dis., 7: 107-115.
- REALI D., CAROLI G., FILIPPI S., SIMONETTI S. (1977). Isolamento e identificazione di vibrioni alofili possibili agenti di tossinfezione alimentare. Ann. Sclavo, 19 (3): 455-463.
- TOUMANOFF C. (1967a). Infection bactériennes chez les écrevisses. Deuxième note: *Citrobacter*, *Enterobacter*. Bulletin Français de Pisciculture n. 221: 117-133.
- TOUMANOFF C. (1967b). Infection bactériennes chez les écrevisses. Troisième note: *Pseudomonaceae* = *Pseudomonas alcaligenes* (Monias, 1928) et *Alcaligenes* (*Bacillus faecalis alcaligenes* Petruschky 1896) et quelques bactéries proches. Bulletin Français de Pisciculture n. 227: 45-55.
- VEY A. (1981). Les maladies des écrevisses, leur reconnaissance et la surveillance sanitaire des population Astacicoles. Bulletin Français de Pisciculture n. 281: 223-236.
- VOGT G. (1999). Diseases of European freshwater crayfish, with particular emphasis on interspecific transmission of pathogens. Diseases of European freshwater crayfish, 8: 7-10.
- VOGT G. & RUG M. (1999). Life stage and cycle di *Psorospermium haeckeli*, a species of the novel DRIPs clade from the animal fungal dichotomy. J. Exp. Zool., 283: 31-42.