

E. CASONI¹, G. CONTIS¹, L. AGUIARI², M. MISTRI¹, C. MUNARI¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche, Farmaceutiche ed Agrarie, Università degli Studi di Ferrara – Via Luigi Borsari, 46, Ferrara

²Naturedulis s.r.l., Goro (FE)
csnlei@unife.it

TEST SULL'EFFICACIA DI DISINFEZIONE DELLE COLTURE DI ISOCHRYSIS GALBANA (VAR. T-ISO) TRAMITE ACIDO PARACETICO (PAA) E PROBIOTICO PHAEOBACTER INHIBENS (RHODOBACTERACEAE)

DISINFECTION EFFICACY TEST ON ISOCHRYSIS GALBANA CULTURES (VAR. T-ISO) USING PERACETIC ACID (PAA) AND PROBIOTIC PHAEOBACTER INHIBENS (RHODOBACTERACEAE)

Abstract - One of the main threats for aquaculture is represented by microbial pathogens, causing mass mortality episodes in mollusk hatcheries. Among the many disinfection methods applied to reduce this issue, use of chemicals and probiotics seems to be efficient. In this study we tested two methods: a chemical, Paracetic Acid (PAA), and a probiotic, *Phaeobacter inhibens*. Analyses were carried out on microalgae culture of *Isochrysis galbana* (var. T-ISO). Both remedies were tested in different concentrations, to obtain an optimal breakdown of the pathogens. Experimental trials were conducted in laboratory scale and inside photobioreactors (PBRs). PAA showed no harmful effect on microalgae, and treatment that gave the best results involved the chemical dosed with a concentration of 60 µg/L, in laboratory and PBRs scale. Probiotic treatment dosed with a concentration of 10⁴ cfu/ml showed no harmful effect also. These preliminary results show the potential efficacy of the two tested methods.

Keywords: Aquaculture, Microbial pathogens, Microalgae, Paracetic Acid, *Phaeobacter inhibens*

Introduzione – I problemi legati all'allevamento di molluschi, soprattutto negli stadi larvali, sono molteplici e dovuti a diversi fattori: bassa qualità dell'acqua, sovrappollamento, temperatura inadeguata, patogeni e metaboliti algali. La maggior parte degli eventi di mortalità è associata ad un'elevata carica batterica; per questo motivo, una buona qualità dell'acqua è considerata la principale misura precauzionale per evitare malattie e patologie. La disinfezione dell'acqua è il principale strumento utilizzato per garantire la salute degli animali allevati. Nel caso della molluschicoltura, questa precauzione va adottata anche sulle colture algali nei fotobioreattori, utilizzate come nutrimento per tutte le fasi di vita dei bivalvi allevati. Sostanze chimiche come l'acido paracetico (PAA), che mostra un'efficacia di disinfezione su un ampio spettro di organismi patogeni (Kitis, 2004), sembra rappresentare una valida soluzione al problema. Più di recente sembra essere stata presa in considerazione l'alternativa di usare organismi probiotici, ovvero "microorganismi che se dosati correttamente possono garantire effetti benefici sull'ospite al quale vengono somministrati" (FAO). *Phaeobacter inhibens* è uno di questi. Largamente studiato in acquacoltura, si è rivelato efficace soprattutto contro batteri del genere *Vibrio*, ma anche su altri ceppi patogeni, ad esempio alcuni membri del genere *Aeromonas* e *Tenacibaculum* (Sonnenschein et al., 2021). In questo lavoro, i due rimedi sopra citati sono stati testati sulle colture della microalga *Isochrysis galbana* Parke (var. T-ISO), per individuare una concentrazione che garantisca l'efficacia dei due disinfettanti, senza influire negativamente sulla crescita delle alghe.

Materiali e metodi – L'esperimento è stato eseguito impostando tre prove: due in scala ridotta di laboratorio, ed una su scala industriale, utilizzando fotobiorattori (PBRs). Durante la prima prova in laboratorio colture algali da 150 ml sono state mantenute in beute di vetro del volume di 500 ml, in condizioni ottimali alla crescita, per 48 ore, ed è stato testato l'effetto di diverse concentrazioni di PAA: 7,5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L e 60 µg/L. Ogni trattamento è stato replicato 3 volte. Nella seconda prova di laboratorio è stato osservato l'effetto del probiotico *Phaeobacter inhibens* DSM1735 (Ruiz-Ponte *et al.*, 1998), dosato ad una concentrazione di 10⁴ cfu/mL. Come per la prova precedente anche per questo trattamento sperimentale sono stati effettuate tre repliche. In questo caso però la prova ha avuto una durata di 72 ore.

Nella terza prova i rimedi sono stati inoculati in colture da 150 L, all'interno di tre diversi fotobioreattori: un PBR con trattamento PAA (60 µg/L), un PBR con probiotico (10⁴ cfu/mL) ed un PBR adibito a controllo, privo di trattamento. Le analisi hanno avuto una durata di 48 ore. Per tutte e tre le prove, crescita algale e pH sono stati monitorati giorno per giorno (T₀, 24h; T₁, 24h; T₂, 48h; T₃, 72h). La crescita algale è stata osservata contando le cellule tramite camera di Neubauer (Fig. 1) e utilizzando la seguente formula:

$$\text{cell} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{cell contate}}{N^{\circ} \text{quadranti contati}}$$



Fig. 1 – A sinistra un esempio di camera di Neubauer. A destra il particolare del reticolo costituito dai quadranti con lato 0,2 mm, all'interno dei quali vengono contate le cellule.

On the left, an example of a Neubauer chamber. On the right, a detail of the grid made up of squares with 0.2 mm sides, within which the cells are counted.

Inoltre, per comparare l'effetto dei diversi trattamenti è stato calcolato il tasso di crescita specifico medio (μ), tramite la formula:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{T_n - T_0}$$

Dove: N_0 è il numero di cellule/ml osservate a T_0 ; N_n è il numero di cellule/ml misurate a T_n ; T_0 è il momento della prima conta cellulare all'inizio del test; T_n è il momento della n -esima conta cellulare dall'inizio del test.

Risultati – I risultati preliminari ottenuti da ogni prova effettuata hanno mostrato come nessuno dei due rimedi causa effetti negativi sulla crescita algale, che quindi non risulta inibita. Nella prima prova in laboratorio, utilizzando PAA, i risultati migliori sono stati ottenuti dal trattamento in cui la sostanza chimica è stata somministrata ad una concentrazione di 60 µg/L, ottenendo una densità algale a T_2 di 8,64x10⁶ cell/ml. La densità cellulare minore invece (T_2 di 4,62x10⁶ cell/ml) è stata registrata nel trattamento il cui PAA è stato somministrato ad una concentrazione di 30 µg/L (Fig. 2a).

Risultati simili sono stati ottenuti calcolando il tasso di crescita specifico medio, μ : i valori più alti corrispondono al trattamento 60 $\mu\text{g/L}$ ($\mu = 0,033 \times 10^6$ cell/ml/h), mentre i più bassi sono relativi al trattamento 30 $\mu\text{g/L}$ ($\mu = 0,015 \times 10^6$ cell/ml/h) (Fig. 3a).

Anche nella seconda prova in laboratorio, somministrando *P. inhibens*, la crescita algale non ha risentito del trattamento, ottenendo una densità cellulare a T_3 più alta nel gruppo trattato (10^4 cfu/ml) rispetto al gruppo di controllo. Rispettivamente, $5,07 \times 10^6$ cell/ml e $4,46 \times 10^6$ cell/ml (Fig. 2b). La stessa tendenza è stata osservata nei valori μ relativi a questa prova: $0,020 \times 10^6$ cell/ml/h per il trattamento e $0,018 \times 10^6$ cell/ml/h per il gruppo di controllo (Fig. 3b). La prova all'interno dei PBRs ha mostrato i risultati migliori nel fotobioreattore trattato con PAA somministrato ad una concentrazione di 60 $\mu\text{g/L}$, ottenendo una densità cellulare finale di $4,16 \times 10^6$ cell/ml. Il trattamento con probiotico ha permesso alle alghe di crescere fino ad una densità di $3,55 \times 10^6$ cell/ml. Una densità leggermente minore invece corrisponde al gruppo di controllo, che dopo due giorni era a $3,46 \times 10^6$ cell/ml (Fig. 2c). Anche in questo caso i valori μ riflettono i risultati della densità cellulare (Fig. 3c). In linea generale, si può osservare come le colture trattate con PAA abbiano ottenuto risultati migliori, in termini di crescita algale, sia durante le prove in laboratorio sia nelle prove condotte all'interno dei fotobioreattori.

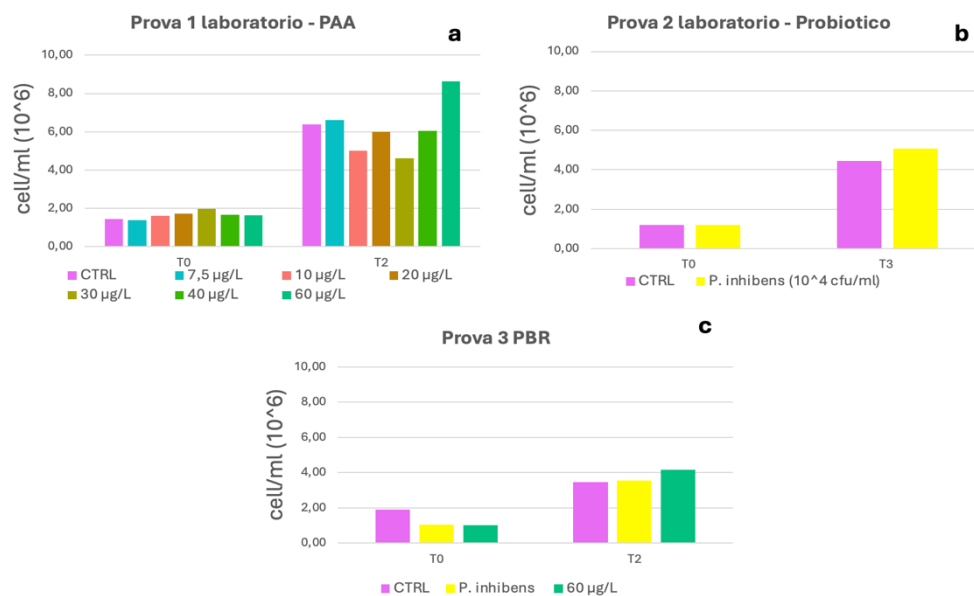


Fig. 2 – Crescita cellulare relativa a ciascun trattamento testato durante l'esperimento. Risultati relativi a: (a) prima prova laboratorio, con PAA. $T_0=0\text{h}$, $T_2=48\text{h}$; (b) seconda prova in laboratorio con *P. inhibens*. $T_3=72\text{h}$; (c) terza prova eseguita nei PBRs.

Cell growth related to every treatment tested during the experiment. Results of: (a) First laboratory trial involving PAA. $T_0=0\text{h}$, $T_2=48\text{h}$; (b) Second laboratory trial, involving *P. inhibens*. $T_3=72\text{h}$; (c) Third trial carried out in PBRs.

Conclusioni – Nonostante quelli descritti siano solo risultati preliminari, i dati ottenuti dimostrano come i due metodi analizzati non influiscano negativamente sulla crescita microalgale delle colture di *Isochrysis galbana*. Anche se i risultati relativi all'efficacia contro organismi patogeni non sono presenti, il PAA è ampiamente utilizzato per questo scopo da diverso tempo (Baldry *et al.*, 1991). Oltre alla sua azione antimicrobica, questa sostanza ha un impatto minimo sull'ambiente di allevamento e naturale. Il reagente infatti ha un tempo di degradazione molto ridotto, producendo acido acetico, perossido di idrogeno e acqua (Pedersen *et al.*, 2009).

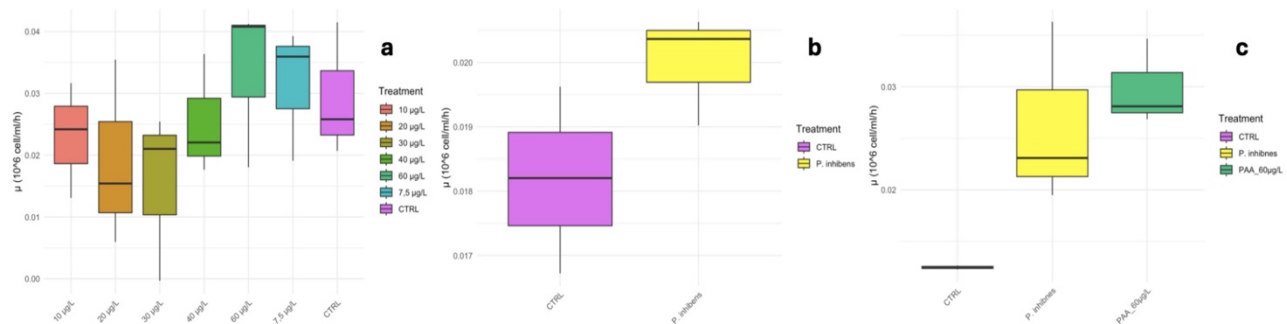


Fig. 3 – Tasso di crescita specifico medio (μ) per ciascun trattamento testato durante le tre prove. Risultati relativi a: (a) prima prova di laboratorio con PAA; (b) seconda prova di laboratorio con *P. inhibens*; (c) terza prova condotta nei PBR. I valori sono espressi in 10^6 cellule/ml/h.

Average specific growth rate (μ) of every treatment tested during the three trials. Results of: (a) First laboratory trial involving PAA; (b) Second laboratory trial involving *P. inhibens*; (c) Third trial carried out in PBRs. Values are expressed as 10^6 cell/ml/h.

Considerata inoltre la variazione minima di pH generata nelle colture trattate, l'efficacia di questo rimedio va attribuita ad un altro meccanismo. Sembra infatti che il PAA sia in grado di alterare la permeabilità della membrana cellulare e interferire con la sintesi proteica degli organismi patogeni (Oyarzabal, 2005).

Anche l'efficacia di *P. inhibens* è stata testata in diversi studi, nei quali sono state identificate due principali caratteristiche che lo rendono un buon candidato come probiotico: la formazione di biofilm e la produzione di acido tropoditietico (TDA). La formazione di biofilm agisce impedendo la colonizzazione delle superfici ad altre specie microbiche. Il TDA invece è un metabolita secondario prodotto dai membri della famiglia delle Rhodobacteriaceae, che agisce alterando il gradiente di membrana dei microorganismi patogeni (Wilson *et al.*, 2016).

Considerate queste caratteristiche possiamo concludere che, oltre a non influire negativamente sulla crescita delle colture cellulari, questi due rimedi hanno buone potenzialità per essere efficaci in termini di disinfezione degli ambienti di allevamento. In termini di efficacia relativa dei due rimedi, sembra che il PAA permetta di ottenere risultati migliori, considerando la densità algale al termine dell'esperimento. Riguardo a questi ultimi aspetti ulteriori analisi verranno eseguite, integrando i risultati fino ad ora ottenuti.

Bibliografia

- BALDRY M.G.C., FRENCH M.S., SLATER D. (1991) - The Activity of Peracetic Acid on Sewage Indicator Bacteria and Viruses. *Water Sci. Technol.*, **24** (2): 353-357.
- KITIS M. (2004) - Disinfection of Wastewater with Peracetic Acid: A Review. *Environ. Int.*, **30** (1): 47-55.
- OYARZABAL O. A. (2005) - Reduction of *Campylobacter Spp.* by Commercial Antimicrobials Applied during the Processing of Broiler Chickens: A Review from the United States Perspective. *J. Food Prot.*, **68** (8): 1752-1760.
- PEDERSEN L.F., PEDERSEN P.B., NIELSEN J.L., NIELSEN P.H. (2009) - Peracetic Acid Degradation and Effects on Nitrification in Recirculating Aquaculture Systems. *Aquac.*, **296** (3-4): 246-254.
- RUIZ-PONTE C., CILIA V., LAMBERTL C., NICOLASL J.L. (1998) - *Roseobacter Gallaeciensis* Sp. Nov., a New Marine Bacterium Isolated from Rearings and Collectors of the Scallop *Pecten Maximus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **48** (2): 537-542.
- SONNENSCHNEIN E.C., JIMENEZ G., CASTEX M., GRAM L. (2021) - The Roseobacter-Group Bacterium *Phaeobacter* as a Safe Probiotic Solution for Aquaculture. *Environ. Microbiol.*, **87** (5): e02581-20.
- WILSON M.Z., WANG R., GITAI Z., SEYEDSAYAMDOST M.R. (2016) - Mode of Action and Resistance Studies Unveil New Roles for Tropodithietic Acid as an Anticancer Agent γ -Glutamyl Cycle as a Proton Sink. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **113** (6): 1630-1635.