

## Nota breve - Short note

# Disinfezione di acque da acquacoltura microbiologicamente inquinate mediante una nuova tecnica fotochimica a basso impatto ambientale

Fabiola PATERNO<sup>1,2</sup>, Michela MAGARAGGIA<sup>2\*</sup>, Filippo FACCENDA<sup>1</sup>, Fernando LUNELLI<sup>1</sup>, Andrea GANDOLFI<sup>1</sup> & Giulio JORI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Valorizzazione delle Risorse Naturali, Istituto Agrario di S. Michele all'Adige - Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38010 S. Michele all'Adige (TN), Italia

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, Via U. Bassi 58/B, 35121 Padova, Italia

\* E-mail dell'Autore per la corrispondenza: [michela.magaraggia@unipd.it](mailto:michela.magaraggia@unipd.it)

---

**SUMMARY** - *Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact* - Saprolegniasis is a fish mycosis. It frequently develops in freshwater farming and induces damage to both eggs and adult fish. Our study investigate the potential of porphyrin-type photosensitizers to fight saprolegniasis, using pilot aquaculture plants involving artificially *Saprolegnia*-infected rainbow trouts and trout eggs. We selected two cationic porphyrins, namely C1 and C14. Pilot plants studies indicated that both photoactivated porphyrins prevent *Saprolegnia* infections or promote the complete remission from saprolegniasis in infected trouts or eggs, with no detectable effect on fish's and embryo's physiology. The procedure promises to be of low cost and to have a low environmental impact.

*Parole chiave:* *Saprolegnia*, porfirine, terapia fotodinamica, uova, trota iridea, *Oncorhynchus mykiss*

*Key words:* *Saprolegnia*, porphyrins, photodynamic therapy, eggs, Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

---

## 1. INTRODUZIONE

La saprolegniosi è una micosi ubiquitaria degli organismi acquatici che può frequentemente svilupparsi negli impianti ittici d'acqua dolce, e che conseguentemente crea danni ingenti sia alla produzione di uova, riducendone la percentuale di schiusa, sia ai pesci adulti causando indebolimento dei soggetti infetti e infine la loro morte. Gli allevatori, per contrastare il problema, si affidano spesso a disinfettanti disponibili in commercio con il miglior rapporto efficacia-prezzo, sottovalutando o ignorando i possibili risvolti negativi, causati dall'utilizzo pressoché giornaliero, per prolungati periodi di tempo, di queste sostanze. Tali effetti spesso si manifestano a lungo andare con effetti cronici sul materiale ittico, sull'ambiente e sulla salute umana. Infatti, come si può constatare dalle esperienze passate, prima dell'applicazione pratica di un nuovo disinfettante in acquacoltura, si eseguivano approfonditi studi sul prodotto al fine di definire le concentrazioni efficaci di utilizzo e le dosi tossiche per i pesci, e solo in seguito, talvolta in ritardo di anni o decenni, venivano alla luce problemi correlati quali il rischio ambientale, la sicurezza degli operatori e dei consumatori, tutto questo favorito da normative sanitarie lacunose. Un esempio che può essere citato è quello

del verde malachite, usato primariamente nell'industria come colorante, e successivamente come disinfettante in acquacoltura per la sua dimostrata azione antimicotica. E' stato messo al bando alla fine degli anni settanta dopo circa cinquant'anni di utilizzo per le sue pericolose proprietà teratogene, mutagene, cancerogene, e per la capacità di bioaccumulo manifestata nelle carni del pesce. Il verde malachite è stato quindi sostituito dalla formalina (una soluzione di formaldeide al 30% o 24%), un valido sostituto dal punto di vista antimicotico, e tuttora molto diffuso nelle pescicoltura moderne, ma classificato da diversi istituti di ricerca quali l'International Agency for Research on Cancer (IARC), come cancerogeno per l'uomo. La sensibilizzazione degli operatori del settore, dell'opinione pubblica, e della classe politica dovrebbe portare in futuro alla completa sostituzione di tale disinfettante presso gli impianti ittici, colmando tale lacuna con prodotti efficaci e allo stesso modo sicuri per gli operatori del settore e i consumatori, non trascurando inoltre l'impatto ambientale indotto su corsi d'acqua dove vengono scaricate le acque reflue degli impianti. Le porfirine, sia in quanto tali, sia in associazione con luce visibile o luce solare, possiedono i prerequisiti necessari per diventare un valido sostituto alla formalina, avendo già dimostrato di svolgere un'efficace azione antibatterica e allo

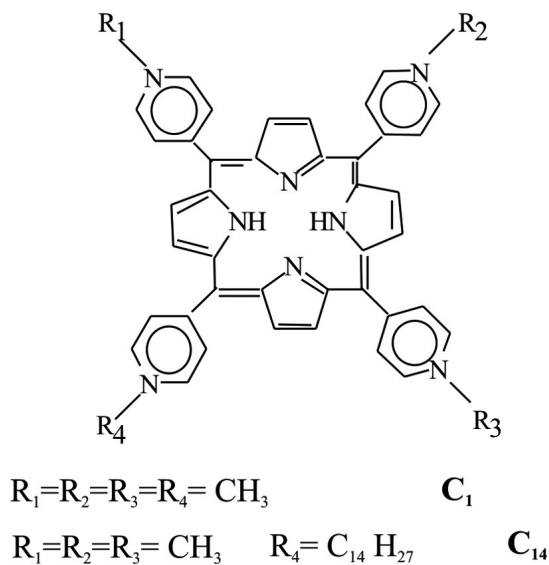


Fig. 1 - Struttura della porfirina.  
Fig. 1 - Structure of porphyrine.

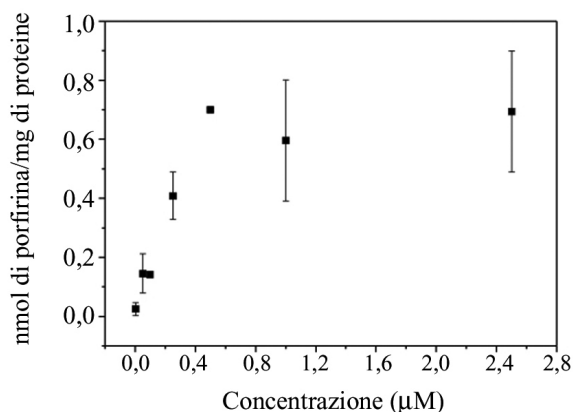


Fig. 2 - Accumulo di C1 in cellule di *Saprolegnia* in funzione della concentrazione. Tempo di incubazione pari a 5 min.  
Fig. 2 - Effect of the porphyrin concentration on the uptake of C1 by *Saprolegnia* cells after a 5 min incubation in the dark.

stesso tempo di non indurre effetti tossici, oltre ad avere un basso impatto ambientale alle dosi che sono attive fotochimicamente. Le porfirine agiscono come fotosensibilizzatori; esse cioè assorbono specifiche lunghezze d'onda nel visibile (da segnalare la banda di Soret a circa 400 nm) e trasferiscono l'energia, derivante dall'eccitazione elettronica, ai substrati circostanti o all'ossigeno molecolare, generando specie citotossiche altamente reattive. Nel caso dell'ossigeno, si ha la formazione principalmente di ossigeno di singoletto e, in misura minore di anione superossido,  $O_2^-$ , il quale può, in presenza di  $H^+$ , dare origine ad altre specie altamente reattive come  $H_2O_2$  e il radicale ossidrilico OH (Rodgers 1985). Le porfirine utilizzate si caratte-

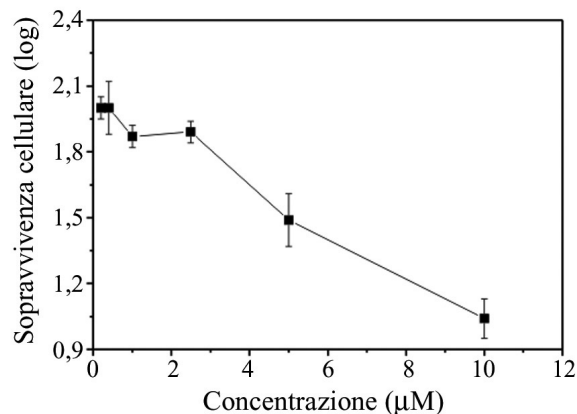


Fig. 3 - Sopravvivenza di cellule di *Saprolegnia* incubate per 30 min con C1 a diverse concentrazioni e successivamente irradiate per 10 min con luce bianca (400-800 nm) alla v velocità di fluena di  $100\text{ mW cm}^{-2}$ .

Fig. 3 - Effect of the porphyrin concentration on the survival of *Saprolegnia* cells incubated for 30 min with C1 porphyrin and irradiated for 10 min with white light (400-800 nm) at a fluence rate of  $100\text{ mW cm}^{-2}$ .

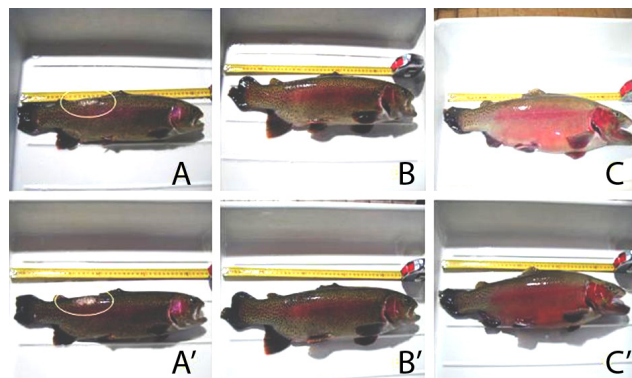


Fig. 4 - Individui adulti di trota sottoposti ad infezione artificiale di *Saprolegnia* ad una settimana (pannello superiore) o due settimane (pannello inferiore) dall' inoculo. A, A': Controllo; B, B': C1  $0,6\text{ mg l}^{-1}$  + luce; C, C': C14  $0,3\text{ mg l}^{-1}$  Buio.

Fig. 4 - Adult trouts artificially infected by *Saprolegnia* after 1 week (upper panel) or two weeks (lower panel) of treatment. A, A': Control; B, B': C1  $0.6\text{ mg l}^{-1}$  + light; C, C': C14  $0.3\text{ mg l}^{-1}$  Dark Incubated.

rizzano per la presenza di quattro sostituenti piridinici nelle posizioni meso del macrociclo tetrapirrolico; nella porfirina C1 l'azoto dell'anello piridinico è legato a gruppi metilici, conferendo alla molecola quattro cariche positive. Nella porfirina C14 un sostituito metilico è rimpiazzato da una catena tetradeccilica, con conseguente aumento dell'idrofobicità complessiva della molecola (Fig. 1).

Scopo di questo studio consiste quindi nello sperimentare le attuali conoscenze e tecnologie applicate in terapia fotodinamica con porfirine e loro derivati, applicandole in un settore completamente nuovo quale può essere l'acquacoltura, ed in particolare effettuando studi di fotosensibilizzazione sia *in vitro* che *in vivo*.

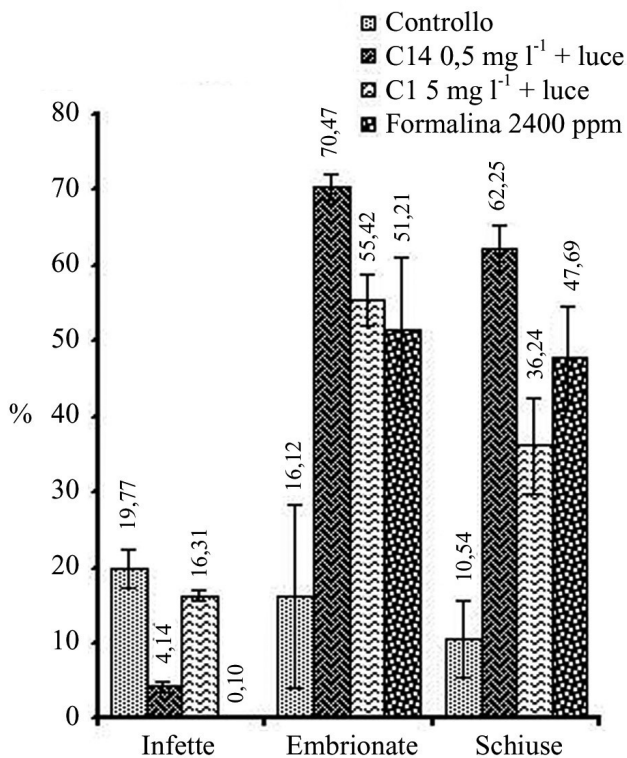


Fig. 5 - Differenti effetti dei protocolli di trattamento sulle uova di trota.

Fig. 5 - Different effects of treatment protocols on trout eggs.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1. Studi di accumulo

Le ife di *Saprolegnia* spp. sono state incubate per 5 minuti al buio con differenti concentrazioni di porfirina, variabili da 0,025 a 2,5  $\mu\text{M}$ , e successivamente centrifugate e lavate in PBS. Il pellet è stato risospeso in una soluzione acquosa di SDS al 2%, incubato overnight e diluito nello stesso solvente. Un'aliquota della soluzione è stata utilizzata per misurare l'intensità di fluorescenza mentre un'altra aliquota è stata utilizzata per determinare la concentrazione di proteine mediante il saggio dell'acido bicinconico (Smith *et al.*, 1985; Lowry *et al.*, 1951). In questo modo è stato possibile esprimere la quantità di fotosensibilizzatore legato al micelio come:

$$(\text{nmol di porfirina}) (\text{mg di proteine cellulari})^{-1}.$$

### 2.2. Studi di fotosensibilizzazione

Campioni irradiati e non irradiati sono stati preparati aggiungendo predeterminati volumi di porfirina alla sospensione di ife; la concentrazione finale del fotosensibilizzatore variava da 0,01 a 10 mM. Dopo un'incubazione al buio a 37°C pari a 30 minuti, le ife sono state irradiate con luce bianca (100 mW  $\text{cm}^{-2}$ ) per tempi compresi tra 10 e 20 minuti rispettivamente. I campioni irradiati e non irradiati sono stati diluiti serialmente in PBS e le diluizioni opportune sono state seminate in terreno di crescita GYA (a base di glucosio ed estratto di lievito). Dopo 48 h di incubazione a

20°C è stato eseguito il conteggio delle colonie per calcolare le unità formanti colonia (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ).

### 2.3. Prove di irradiazione su pesci

Tattamento preventivo.

Gruppi di 3 pesci adulti erano sottoposti a raschio nella zona dorsale compresa tra la pinna dorsale e adiposa, seguita dall'inoculo di micelio. Il flusso d'acqua della vasca dei pesci veniva bloccato ed era aggiunta la quantità di porfirina necessaria ad ottenere una concentrazione variabile da 0,3 a 0,6  $\text{mg l}^{-1}$ . L'irradiazione è stato ottenuto mediante un faro alogeno della potenza di 500 W. Allo scadere dell'ora d'irradiazione è stato ristabilito il normale flusso di ricambio d'acqua. I trattamenti con porfirine sono stati effettuati con cadenza giornaliera e si sono protratti per due settimane, per un totale di 10 ripetizioni. Le condizioni dei pesci sono state monitorate giornalmente.

Tattamento curativo.

Pesci adulti già infetti erano prelevati dalla piscicoltura, incubati con porfirina C1 0,6  $\text{mg l}^{-1}$  e quindi irradiati per 1 h con lampade ad incandescenza da 100 W. Il trattamento è stato effettuato con cadenza giornaliera e si è protratto per 1 settimana, per un totale di 6 ripetizioni. Le condizioni dei pesci sono state monitorate giornalmente.

### 2.4. Prove di irradiazione su uova

Campioni eterogenei di uova, precedentemente fecondate artificialmente, sono stati suddivisi in gruppi di circa 2000 esemplari e collocati in ciascuno dei quattro settori in cui erano stati suddivisi gli incubatori a flusso verticali del tipo "vasi di Zug".

L'infezione veniva effettuata mediante somministrazione giornaliera di un volume d'acqua con una carica di *Saprolegnia* pari a 60 UFC  $\text{ml}^{-1}$ . I campioni sono stati addizionati con quantità di porfirine necessarie ad ottenere concentrazioni variabili da 0,5 a 5  $\text{mg l}^{-1}$ ; l'irradiazione è stato ottenuto mediante lampade a vapori di sodio ad alta pressione (50 mW  $\text{cm}^{-2}$ ) per un tempo pari ad 1 h con cadenza giornaliera. La somministrazione delle porfirine e il successivo irradiazione venivano effettuati in una vasca posta di fronte al vaso di Zug, da cui l'acqua veniva pescata e pompata sul vaso mediante un circuito chiuso. Alla fine dell'irradiazione venivano effettuati due sciacqui delle uova con acqua di rubinetto e poi veniva ristabilito il normale flusso d'acqua. Trascorse due settimane dalla fecondazione, periodo necessario per lo sviluppo dell'embrione, le uova dei singoli campioni sono state contate e separate in vitali, non vitali e infette da saprolegniosi, successivamente ne è stato monitorato lo sviluppo sino al completo riassorbimento del sacco vitellino.

## 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Le porfirine C1 e C14 utilizzate, vengono accumulate in concentrazioni significative dalle ife di *Saprolegnia* spp., ed una volta esposte alla luce promuovono un'inattivazione delle ife fungine (Figg. 2, 3).

Per quanto riguarda il trattamento di trote adulte, nelle vasche sperimentali i soggetti sani, trattati con C1 ed

irradiati con luce visibile oppure trattati con C14 in presenza di luce ambientale, non hanno mostrato l'insorgere di infezioni da *Saprolegnia* spp., contrariamente a quello che di norma succede nei sistemi di acquacoltura non trattati. L'azione preventiva è altrettanto utile su soggetti infettati artificialmente che non sviluppano l'infezione, a differenza dei soggetti di controllo (Fig. 4). In individui prelevati da acquacoltura con infezioni spontanee di *Saprolegnia* spp. si nota una progressiva regressione dell'infezione fungina già dai primi trattamenti.

Negli esperimenti effettuati su uova di trota, C1 e soprattutto C14, hanno mostrato una notevole efficienza nella prevenzione d'infezioni da *Saprolegnia* spp., sostanzialmente paragonabile a quella del trattamento con formalina (Fig. 5).

I risultati ottenuti dall'azione delle porfirine su pesci infetti, uova e su *Saprolegnia* spp. in colture in vitro sono molto incoraggianti, in quanto hanno evidenziato che l'azione di queste molecole è equiparabile a numerosi disinfettanti attualmente in uso. In conclusione, l'utilizzazione di porfirine in opportune condizioni sperimentali sembra essere un approccio molto promettente per il trattamento di acque da acquacoltura per la protezione sia di uova sia di

esemplari adulti da infezioni fungine. La tecnica è sicuramente a minimo impatto ambientale e il suo costo dovrebbe essere molto contenuto, poiché le porfirine agiscono a dosi molto basse e l'eventuale fotoattivazione è realizzata attraverso una tecnologia molto semplice come può essere una lampada a emissione nello spettro visibile o in alcuni casi anche la stessa luce solare.

#### BIBLIOGRAFIA

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Rodgers M.A.J. 1985 - Activated oxygen. In: Benasson R.V., Jori G., Land E.J. & Truscott T.G. (eds.) *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, NATO ASI series, Plenum Press, New York: 181-195.
- Smith P.K., Kron R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Garten F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. 1985 - Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150: 76-85