



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Soluzioni innovative per ottimizzare le misure di biosicurezza interna nei sistemi di acquacoltura

Curriculum: Sanità Animale

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie

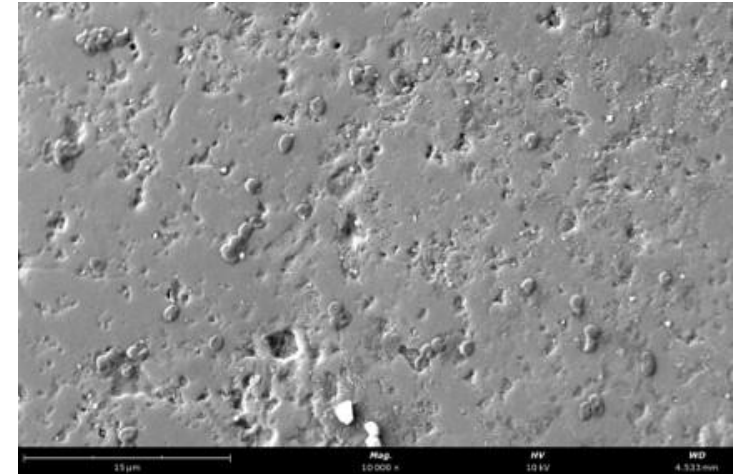
Giorgia Bignami - 38° Ciclo

Supervisore: Marialetizia Fioravanti

Co-Supervisor: Andrea Gustinelli, Alessio Bonaldo, Krunoslav
Bojanić

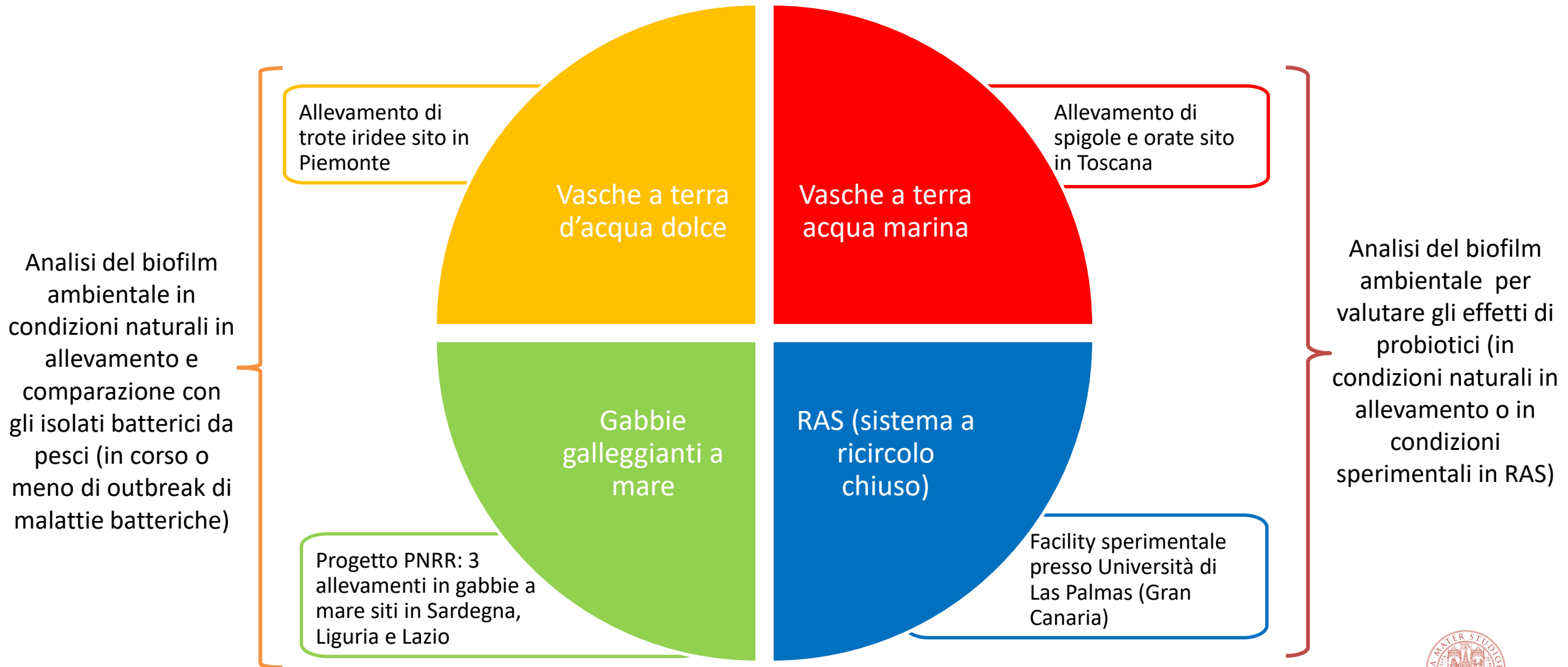
Scopo della ricerca

Le attività di ricerca condotte quest'anno si sono concentrate sullo studio della comunità batterica ambientale in relazione a quella degli organismi acquatici allevati e sulle tecniche utili alla valutazione dell'efficacia di **soluzioni innovative** per la biosicurezza interna.



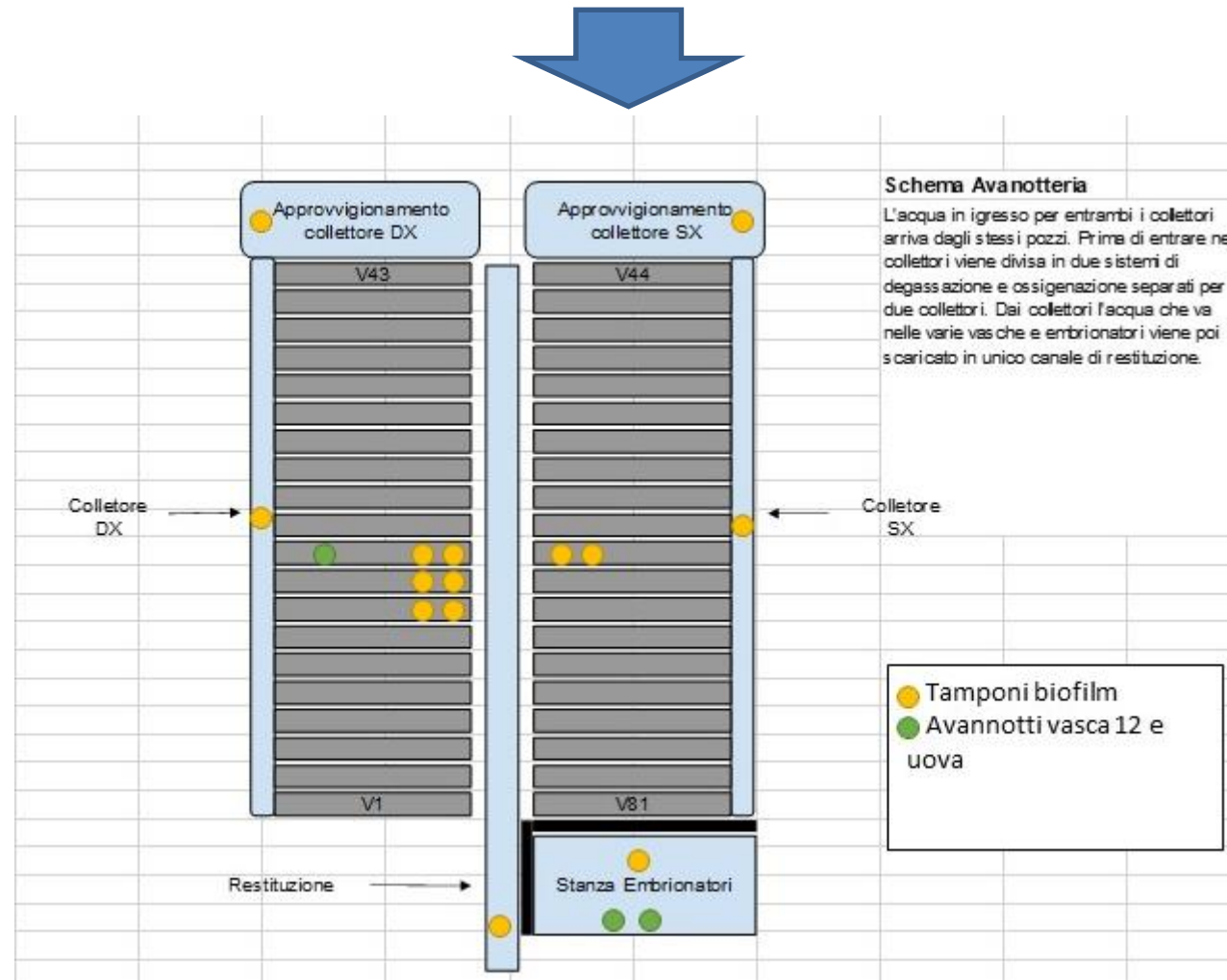
Focus delle attività di ricerca: valutazione della composizione del **biofilm**, in quanto reservoir di batteri ambientali e/o potenzialmente patogeni, in vari substrati di **diversi sistemi di acquacoltura**.

Sistemi di allevamento presi in considerazione per lo studio del biofilm ambientale



Troticoltura sita in Piemonte. 1

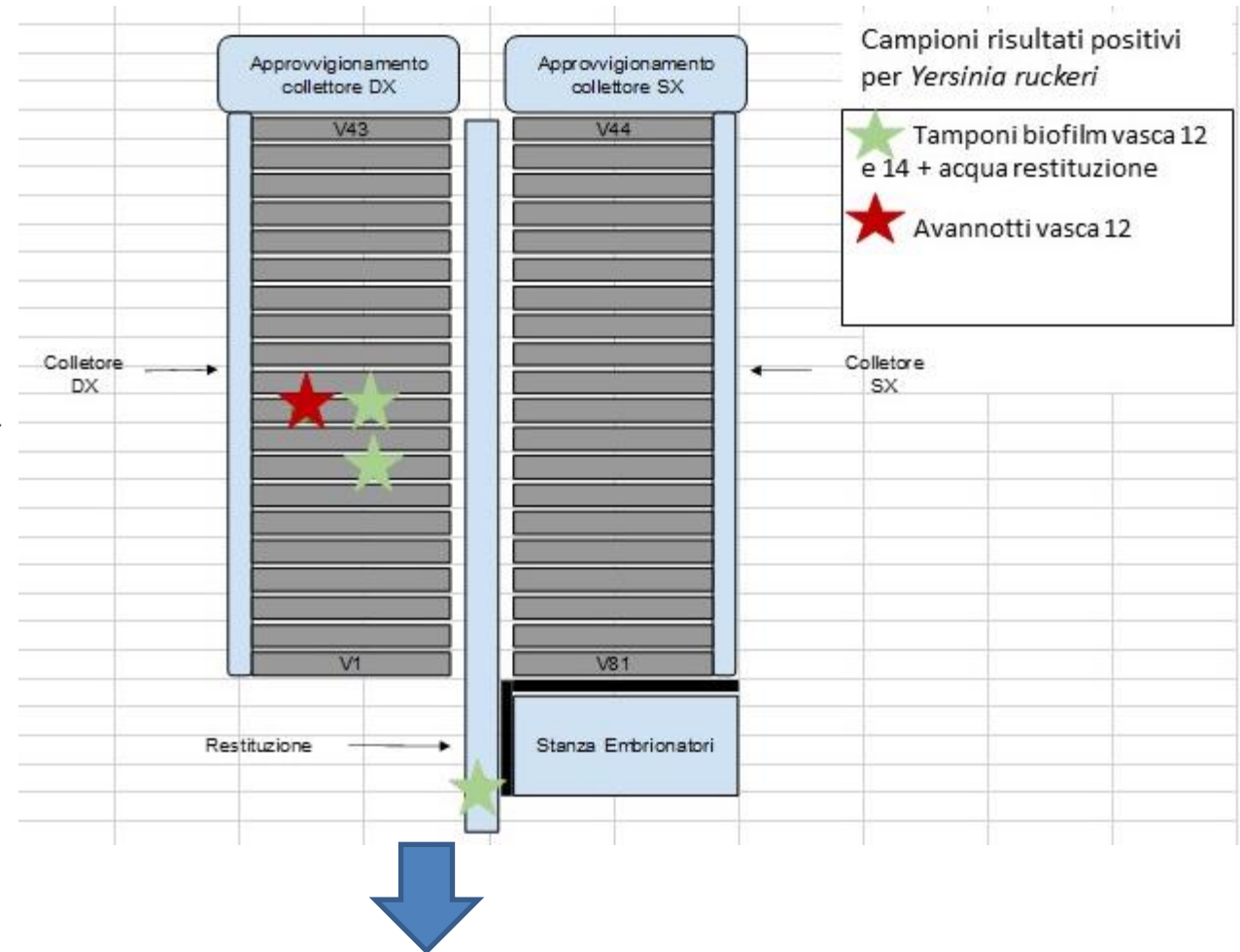
Presso l'avannotteria di trote iridee (*Oncorhynchus mykiss*), che da anni presenta problemi ricorrenti di Bocca Rossa o Yersiniosi causata dal batterio Gram- *Yersinia ruckeri*, sono stati condotti campionamenti di biofilm da diversi punti dell'impianto per valutare se il biofilm rappresentasse un possibile reservoir di questo microrganismo.



Troticoltura sita in Piemonte. 2

Per la ricerca di *Y. ruckeri* si è proceduto con due diverse metodologie, la prima mediante la tecnica di isolamento su terreni di coltura e la seconda finalizzata a rilevare la presenza di *Y. ruckeri* direttamente dal campione mediante un protocollo di PCR specie-specifica per *Y. ruckeri* (Buller, 2014).

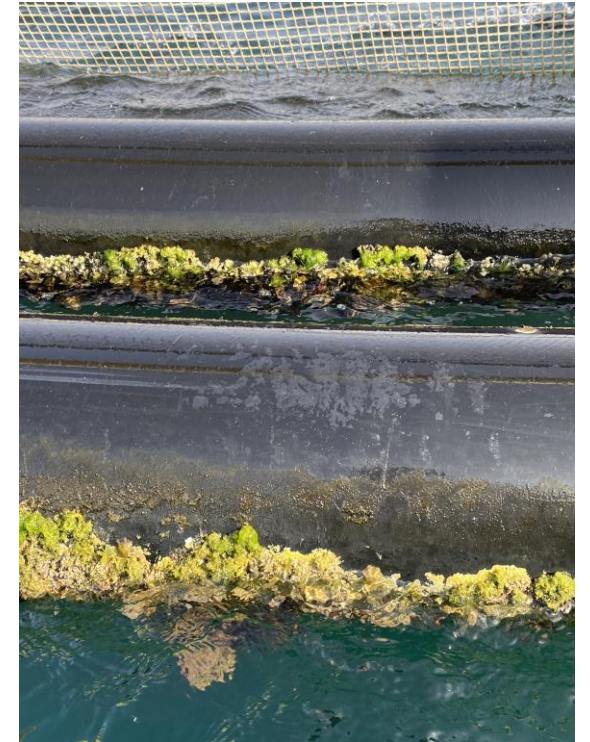
Tutte le colonie clonate ascrivibili a *Y. ruckeri* sono state sottoposte *in primis* ad identificazione su base fenotipica tramite Maldi-TOF (Bruker). Successivamente si è proceduto alla loro conferma genotipica tramite PCR specie-specifica (Buller, 2014). Inoltre, al fine di differenziare i ceppi mobili da quelli immobili, è stato condotto il test su SIM (Sulfide Indole Motility) medium. I campioni risultati positivi sono riportati nello schema a fianco.



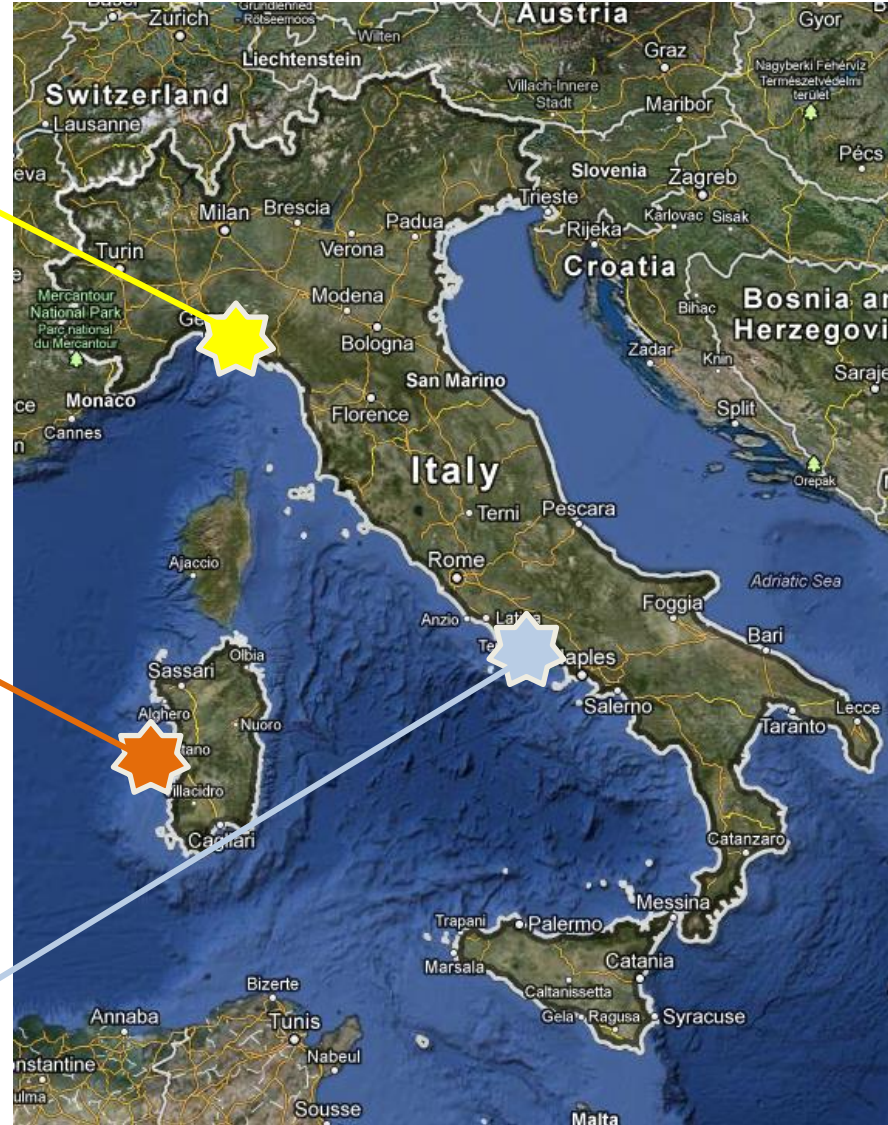
Nei prossimi mesi, dopo la conduzione da parte dell'allevatore del vuoto sanitario e della disinfezione delle vasche dell'avannotteria prima di reintrodurre uova e avannotti, verranno ripetuti i campionamenti del biofilm negli stessi siti, ma con particolare attenzione a quelli risultati positivi per verificare l'eventuale permanenza dell'agente patogeno all'interno della matrice del biofilm adeso alle pareti delle vasche e/o dei collettori idrici.

Allevamenti in gabbie a mare di spigole (*D. labrax*) e orate (*S. aurata*). 1

Nell'ambito del progetto PNRR National Biodiversity Future Center - NBFC, in particolare della task: "Better health and welfare of fish without antimicrobials" il cui obiettivo primario è il miglioramento della salute e del benessere dei pesci allevati senza uso di sostanze chimiche ma con strumenti quali vaccini, diete 'pro-salute', selezione genetica, protocolli di biosicurezza, ecc., sono stati condotti studi del biofilm ambientale, ponendolo in relazione ai microrganismi isolati da pesci e molluschi bivalvi.



Allevamenti in gabbie a mare di spigole (*D. labrax*) e orate (*S. aurata*). 2



Gabbie in mare sommergibili



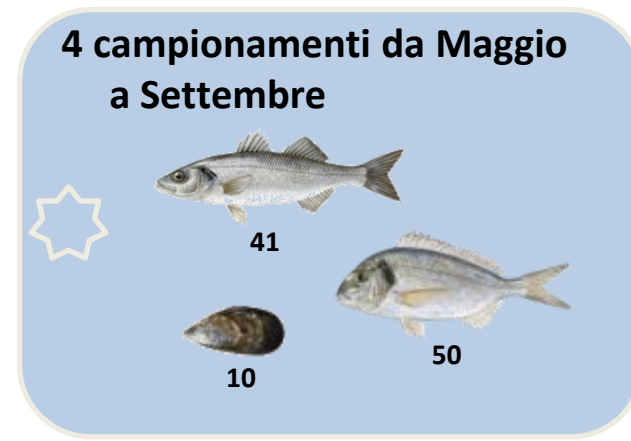
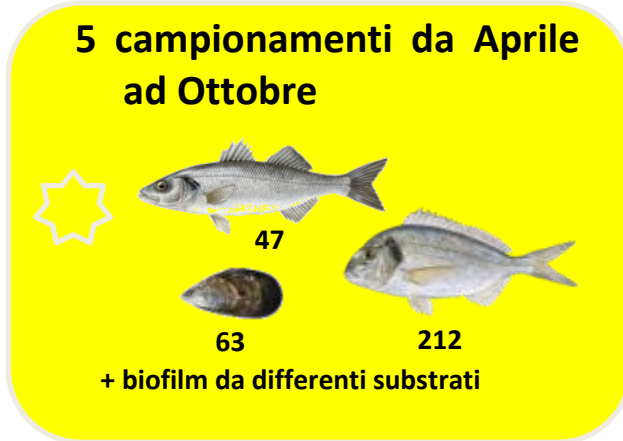
Gabbie in mare IMTA e RAS-IMC



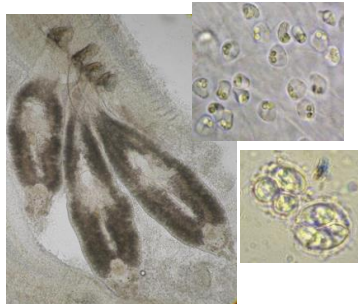
Gabbie in mare



Allevamenti in gabbie a mare di spigole (*D. labrax*) e orate (*S. aurata*). 3

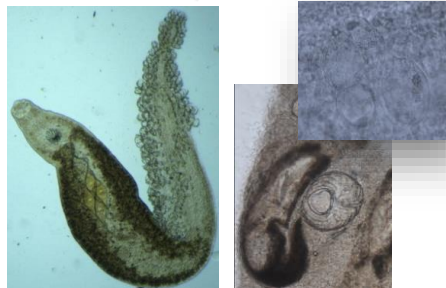


Monitoraggio diagnostico e sorveglianza sanitaria di pesci e molluschi (UNIBO e IMC)

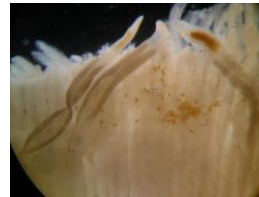


Parassiti: monogenei branchiali, myxozoans e coccidia
Batteri: *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *Aeromonas veronii*, *Piscirickettsia salmonis*

Virus: *Betanodavirus*



Parassiti: monogenei branchiali e digenei Aporocotylid
Batteri: *Epitheliocystis*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *V. ponticus*, *V. scophtalmi*



Parassiti: monogenei branchiali



Batteri: *epitheliocystis*, *V. anguillarum*



Negativo a parassiti e batteri
Virus: *Betanodavirus*



Negativo a parassiti*
Batteri: *V. pomeroyi*
*infezione precedente da stadi larvali di digenei Bucephalid isolati da IMC sono in fase di studio
Virus: *Betanodavirus*




Negativo a parassiti
Batteri: *V. harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*



Negativo a parassiti e batteri
Virus: *Betanodavirus*

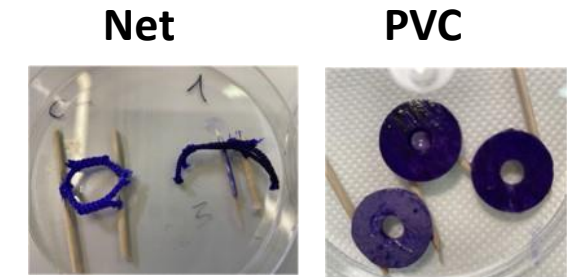
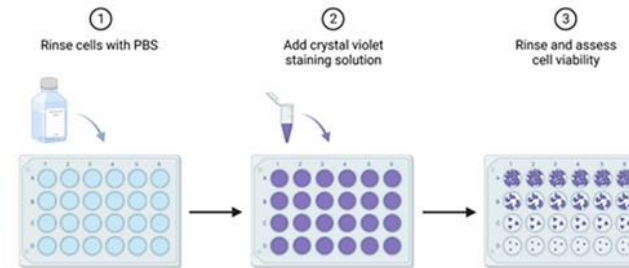


Allevamenti in gabbie a mare di spigole (*D. labrax*) e orate (*S. aurata*). 4

Studio della composizione del biofilm in differenti substrati (rete e PVC) annessi alle gabbie dell'allevamento (UNIBO) 



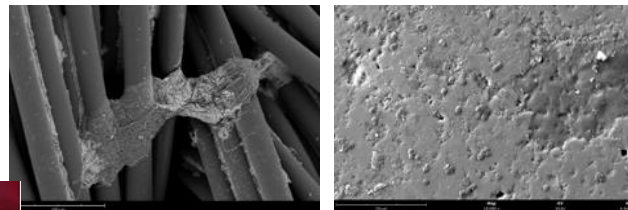
Metodo del Cristal Violetto



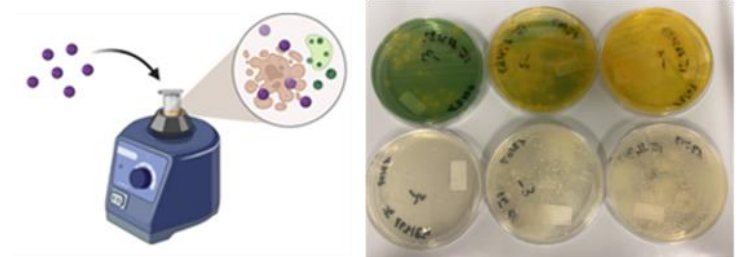
Studio al SEM

Rete

PVC



Raccolta e disgregazione del biofilm, inoculazione da diluizioni in differenti media di coltura, conta delle colonie, clonaggio e identificazione



Vibrio harveyi
Photobacterium damsela subsp. *damsela*
Vibrio alginolyticus
Vibrio ponticus



Prova sperimentale in RAS. 1

Quest'anno, grazie al finanziamento di Aquaexcel 3.0, ho effettuato parte del periodo all'estero presso le facilities dei laboratori **dell'Università di Las Palmas a Gran Canaria (ULPGC-MBS)**.

Collaborando con il Prof. Felix Acosta, abbiamo condotto una prova sperimentale avente scopo di testare *in vivo Bacillus velezensis* addizionato alla dieta commerciale di spigole (*D. labrax*) infettate intraperitonealmente con *Vibrio harveyi*, agente patogeno opportunista sempre più importante nella maricoltura nazionale e capace di produrre biofilm.

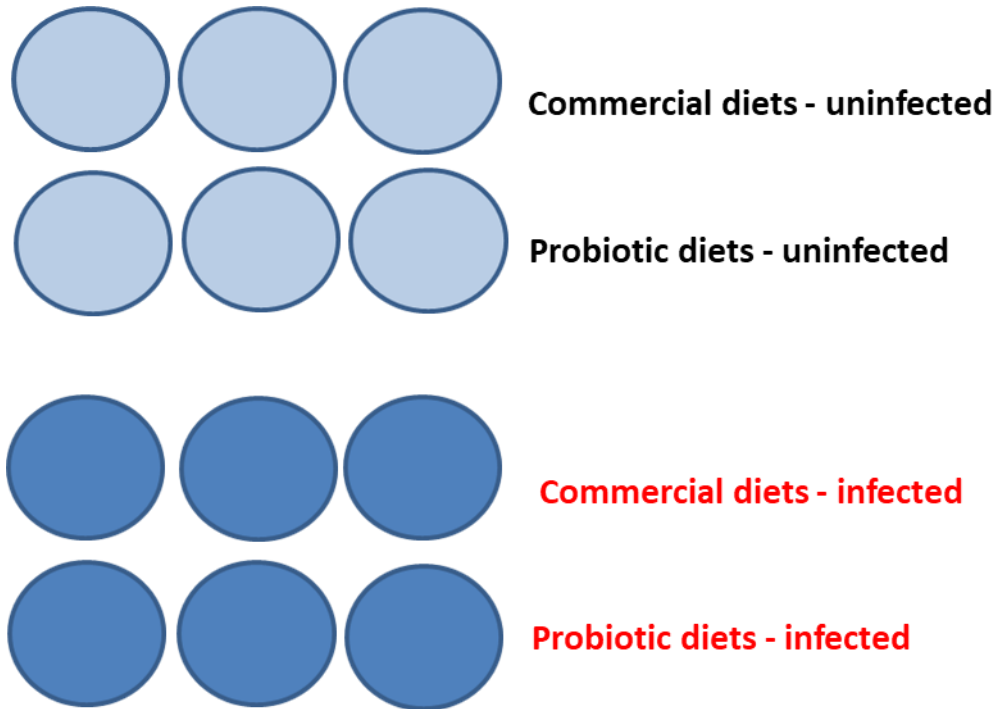
L'uso di antibiotici è a volte necessario per il controllo delle infezioni batteriche, esso però può portare al fenomeno dell'antibiotico resistenza (AMR).

Inoltre, il biofilm ambientale nelle facilities può essere un reservoir di patogeni, riducendo l'efficienza degli antibiotici.

Come dimostrato in anche medicina umana, i probiotici hanno un interessante potenziale per destabilizzare o inibire i patogeni contenuti nel biofilm e nell'ambiente, senza usare farmaci che andrebbero a disperdersi nell'ambiente causando antibiotico resistenza. Inoltre i probiotici vanno ad agire sul quorum sensing, che è il meccanismo attraverso il quale i batteri comunicano fra di loro, bloccando la formazione del biofilm.



Prova sperimentale in RAS. 2



La prova scientifica si è conclusa recentemente e le analisi sono ancora in corso . Verranno effettuate analisi di metagenomica per quanto riguarda il biofilm delle vasche e di microbioma intestinale dei pesci. Verranno analizzati presso i laboratori di Las Palmas i principali parametri del sistema immunitario e verranno allestiti e osservati i vetrini dell'intestino dei pesci per valutarne lo stato post trattamento dal punto di vista istologico.

I dati finora disponibili, anche se in corso di analisi statistica, hanno mostrato buoni risultati riguardo alla mortalità, in quanto i pesci trattati con probiotico sono risultati più resistenti.



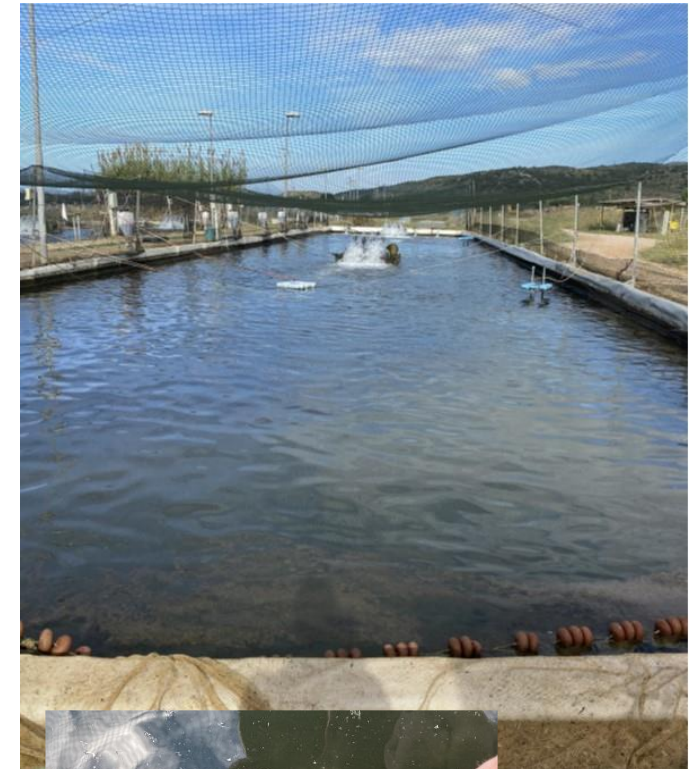
Allevamento di spigole (*Dicentrarchus labrax*) e orate (*Sparus aurata*) in Toscana. 1



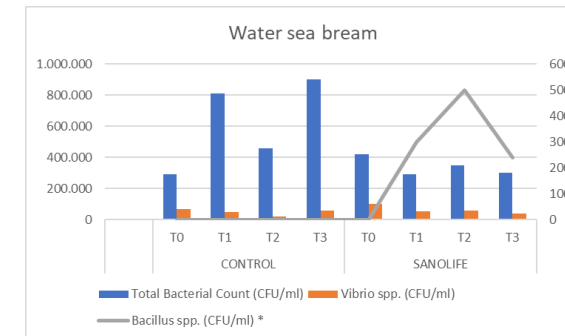
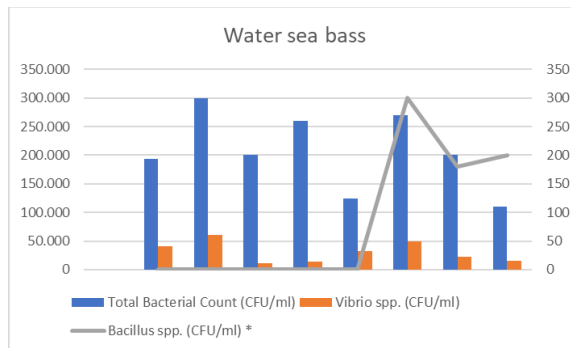
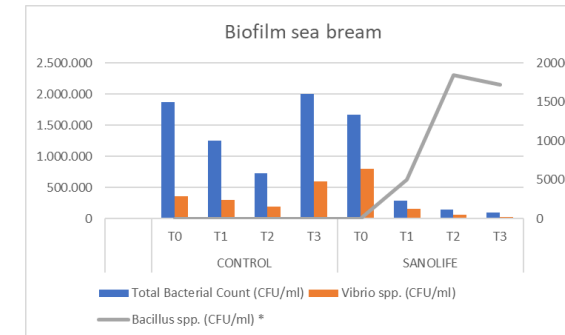
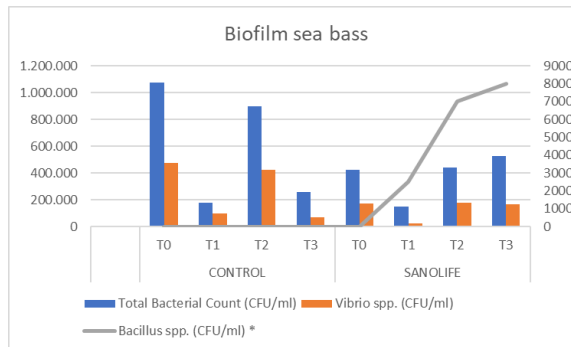
Da quasi un anno stiamo partecipando ad una prova di campo con Inve Aquaculture, azienda produttrice del prodotto SANOLIFE PRO-W, contenente probiotici liofilizzati del genere *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. pumilus*), da utilizzarsi direttamente nell'acqua delle vasche di allevamento.



L'anno scorso è stato pubblicato un interessante lavoro sugli effetti del prodotto SANOLIFE PRO-W in gamberi allevati in Egitto nei confronti del patogeno *Fusarium solani*. Abbiamo così effettuato una sperimentazione con lo stesso prodotto somministrato direttamente nell'acqua delle vasche di spigole e orate, valutando la qualità microbiologica dell'acqua e del biofilm. Attraverso campionamenti periodici durante una normale gestione di allevamento, sono stati presi in considerazione la presenza dei probiotici, l'ammontare dei batteri aerobici totali e di *Vibrio* spp. delle vasche.



Allevamento di spigole (*Dicentrarchus labrax*) e orate (*Sparus aurata*) in Toscana. 2



Sono state effettuate le conte batteriche per diluizione e le colonie più rappresentative sono state identificate tramite Maldi-TOF (Bruker).

Seppur alcuni dati sono interessanti poichè in alcuni casi si è registrata una diminuzione delle conte batteriche totali ed un aumento dei probiotici, l'ammontare dei *Vibrio* spp., quali potenziali patogeni ambientali è risultato pressochè costante e gli impianti presi in considerazione hanno mostrato troppe variabili che rendono difficoltosa una interpretazione dei dati.

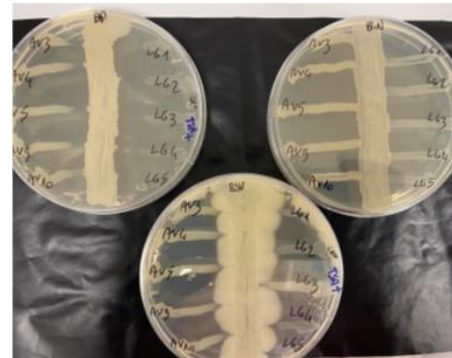
Sono necessarie ulteriori indagini in ambiente controllato per verificare l'efficacia dei probiotici in forma liofilizzata somministrati direttamente nell'acqua delle vasche.

Prova *in vitro* presso RBI, Croazia

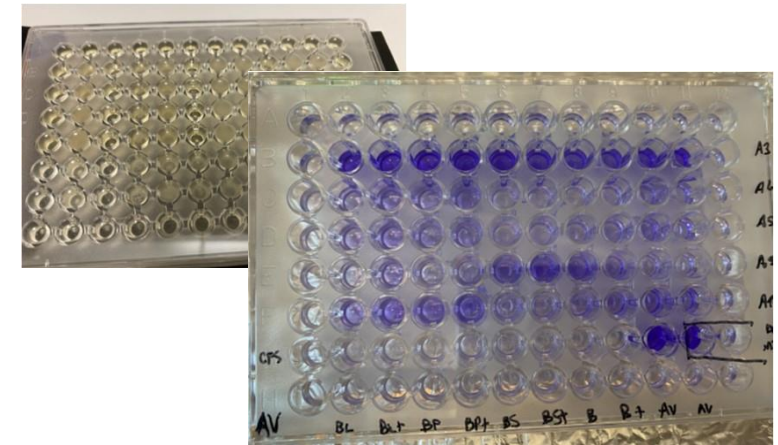
Grazie all'opportunità ottenuta dallo Staff Training promosso da AFORM di Unibo, ho potuto effettuare una prova presso i laboratori di Microbiologia del centro di ricerca **RBI/Scientific Center of Excellence for Marine Bioprospecting di Zagabria**, conducendo test *in vitro* sui probiotici (*Bacillus* spp.) utilizzati nel test *in vivo* presso l'allevamento sito in Toscana utilizzando un nuovo prodotto (Sanolife PRO-2 Inve Aqauculture) contenente anche *Bacillus pumilus*, oltre a *B. subtilis* e *B. licheniformis*.

Sono state condotte prove di antagonismo fra le 3 specie di *Bacillus* nei confronti di *Aeromonas veronii* e *Lactococcus garviae*, patogeni isolati presso il nostro laboratorio dell'Unità di Ittiopatologia del Dimevet, risultati fra i principali agenti patogeni emersi negli ultimi due anni nella maricoltura nazionale e mediterranea.

Abbiamo testato l'antagonismo fra i probiotici e 10 diversi ceppi di patogeni direttamente in piastra a differenti temperature (cross steaking) e in piastra a 96 pozzetti valutando la capacità dei metaboliti degli probiotici di inibire la crescita dei patogeni e la loro capacità di produrre biofilm. (cristal violetto).



Cross steaking method



Prove di crescita su piastra e colorazione del biofilm con cristal violetto



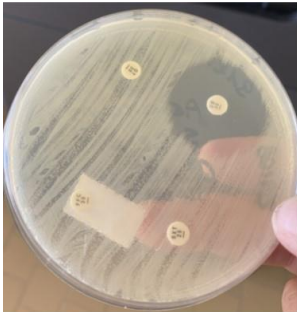
L'analisi statistica dei dati è ancora in corso poiché le prove sono terminate questo mese.

Attività del prossimo anno

- ➔ Conclusione delle attività di ricerca sullo studio del biofilm ambientale in acquacoltura intraprese nell'ambito del progetto PNRR-NBFC elaborando e pubblicando i risultati ottenuti.
- ➔ Conclusione delle attività di ricerca sullo studio del biofilm ambientale in acquacoltura intraprese con l'azienda Inve elaborando e pubblicando i risultati ottenuti. Realizzazione di un nuovo progetto da effettuarsi con il prodotto a base di probiotici in un sistema a ricircolo chiuso (RAS).
- ➔ Verranno terminate entro Novembre le analisi previste nell'ambito del progetto AquaExcel 3.0 condotto presso ULPGC-MBS, procedendo alla stesura di una pubblicazione scientifica. Si sta inoltre valutando, anche su richiesta dei referenti di ULPGC-MBS, la fattibilità di un'ulteriore prova sperimentale presso la stessa sede per studiare gli effetti del probiotico *Bacillus velezensis* nei confronti di altri agenti patogeni di rilievo nella maricoltura mediterranea, al fine di approfondire il possibile utilizzo dei probiotici nella prevenzione e/o mitigazione delle malattie batteriche dei pesci allevati, riducendo così l'utilizzo di terapie antibiotiche in acquacoltura.
- ➔ Realizzazione di un progetto con la collaborazione della Dott.ssa Sandrine Baron (Anses - Unit of Mycoplasmaology, Bacteriology and Antimicrobial Resistance Unit (MBA) per studiare la trasmissione genica di antibiotico resistenza nel biofilm formato dai principali batteri patogeni ittici.



Attività svolte durante l'anno



Diagnosi di malattie batteriche dei pesci e studio del biofilm presso il laboratorio dell'Unità di Ittiopatologia del Dimevet.

Attività didattica: supporto alle esercitazioni nell'ambito dei corsi di: Microbiologia ed epidemiologia veterinaria, Malattie parassitarie degli animali acquatici, Malattie infettive degli animali acquatici e igiene veterinaria del corso di studio di Acquacoltura e Igiene delle Produzioni Ittiche, Cesenatico (FC). Supporto alle attività di laboratorio di tesisti e tirocinanti in relazione ad argomenti di microbiologia.

Nell'ambito del progetto "Global South" di Vet For Africa ho tenuto alcune lezioni teoriche e pratiche sull'acquacoltura e sulla sanità degli animali acquatici, con più specifico riferimento alle malattie batteriche dei pesci allevati, incluse quelle a carattere zoonotico, presso Wolaita Sodo University, Ethiopia, all'interno del training dal titolo "Fishery and Fish pathology" dal 26 febbraio al 1° marzo 2024.



Publicazioni 2024

Articoli su riviste internazionali

Topić Popović N., Bojanić K., Kazazić P.S., Bujak M., Babić S., Strunjak-Perović I., Bignami G., Čož-Rakovac R. (2024). Cultivable bacterial communities from purse-seined small pelagic fish, fishing nets and storage tanks. *Marine Biology*, 171:201. <https://doi.org/10.1007/s00227-024-04520-4>.

Abstracts a convegni

Bignami G., Pirollo T., Tedesco P., Quaglio F., Fioravanti M.L., Campesi E., Da Rugna C., Gridelli S., Gustinelli A. (2024). Episodio di setticemia da *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in pesci violino (*Rhinobatos rhinobatos*) mantenuti in ambiente controllato. Atti del XXVIII Convegno Nazionale della Società Italiana Patologia Ittica (SIPI), Cesenatico, 27-28 giugno 2024, p. 19.

Bignami G., Zanoni R.G., Fioravanti M.L., Fanciulli L., Brundu G., Barbera G., Scaturro G., Valentino A., Gustinelli A. (2024). Studio della composizione batterica del biofilm ambientale in impianti di maricoltura in gabbia. Atti del XXVIII Convegno Nazionale della Società Italiana Patologia Ittica (SIPI), Cesenatico, 27-28 giugno 2024, p. 41.



A close-up photograph of a petri dish held by two hands. The dish contains a dark agar surface with numerous bacterial colonies. Many colonies are circular and have a distinct orange or yellowish-brown color, while others are smaller and more irregular in shape. A semi-transparent blue rectangular box is overlaid on the center of the dish, containing the text "Grazie per l'attenzione" in a dark blue, cursive font.

Grazie per l'attenzione



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Giorgia Bignami

DIMEVET

giorgia.bignami@unibo.it

www.unibo.it