

R. SIMONINI, A. FERRI, S. RIGHI, E. CENNI, V. FERRARI, C. SABIA, R. ISEPPI, D. PREVEDELLI

Università di Modena e Reggio Emilia, via Campi 213/D, 41125 Modena
roberto.simonini@unimore.it

POTENZIALI APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DEI POLICHETI *HALLA PARTHENOPEIA* (OENONIDAE) E *HERMODICE CARUNCULATA* (AMPHINOMIDAE)

POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION OF THE POLYCHAETES *HALLA PARTHENOPEIA* (OENONIDAE) AND *HERMODICE CARUNCULATA* (AMPHINOMIDAE)

Abstract – *A few polychaetes have commercial value, being used as bait or in aquariology and fed industry. Recent research also evidenced that polychaetes could be a source of natural products and employed to exploit the organic wastes produced by fishery and aquaculture. In the present study, we offered mussels and clams simulating bivalve wastes to the polychaetes *Halla parthenopeia* (a valuable bait) and *Hermodice carunculata* (an invasive species in Central Mediterranean). We 1) evaluate the activity of hallachrome, a secondary metabolite produced by *H. parthenopeia*, on different bacterial strains and growth modes, and 2) use *H. carunculata* for the treatment of bivalve waste aimed at recovering and valorising the shells. Hallachrome inhibits the growth of *Candida albicans* and Gram+ bacteria (MIC 0.06-0.25 mM) also in the biofilm growth mode. Fireworms were able to consume up to 0.5 kg of mussel meat per kg of worms per week, leaving almost clean shells.*

Key-words: Bait, hallachrome, bivalve, waste, polychaetes

Introduzione - I policheti costituiscono un gruppo di invertebrati marini ancora poco sfruttato dall'uomo. Essi sono utilizzati soprattutto nella pesca sportiva e come mangimi con elevato valore nutrizionale nell'acquacoltura dei gamberi, ed anche come organismi ornamentali in acquariologia. Spesso sono raccolti dall'ambiente naturale o, in pochi casi, allevati in impianti dedicati (Pombo *et al.*, 2020). I policheti possono trovare impiego anche nell'acquacoltura multitrofica integrata, dove sfruttano gli scarti organici prodotti dalle specie allevate per il consumo umano abbattendone l'impatto ambientale e fornendo biomassa utile a diversificare la produzione dell'impianto (Arduini *et al.*, 2023). In alcune specie dotate di meccanismi di difesa o offesa chimici sono state anche trovate delle sostanze bioattive che possono essere di interesse biotecnologico (Righi *et al.*, 2022). Negli ultimi anni sono state avviate diverse ricerche per identificare e caratterizzare policheti valorizzabili nell'ambito delle "biotecnologie blu" (Pombo *et al.*, 2020; Righi *et al.*, 2022; Arduini *et al.*, 2023). In questo contesto sembrano molto promettenti *Halla parthenopeia* (Delle Chiaje, 1828) ed *Hermodice carunculata* (Pallas, 1766). *H. parthenopeia*, che in Toscana è chiamata "dragone", è un'esca molto apprezzata in Spagna, Francia e lungo le coste del mar Ligure. Gli individui di 25-30 grammi possono costare anche 13-14 euro ciascuno. *H. parthenopeia* è un predatore specializzato in bivalvi che consuma aprendoli e digerendoli con un muco ad azione paralitica e digestiva. Inoltre emette un muco viola che contiene hallacromo, un antrachinone tossico per invertebrati marini (Simonini *et al.*, 2019). *H. carunculata*, meglio conosciuto come "vermocane" (Simonini *et al.*, 2018), è un polichete di grandi dimensioni che in alcune aree del Mediterraneo è diventato invasivo. È un predatore generalista scavenger il cui successo dipende anche dalle sue difese chimiche, basate

sulla presenza di chete urticanti (Simonini *et al.*, 2018) che contengono dei metaboliti secondari caratteristici chiamati carunculine (Righi *et al.*, 2022). Nell'ambito di un progetto finalizzato allo sviluppo di bioraffinerie che consentano lo sfruttamento di rifiuti marini per ridurre l'impatto ambientale ottenendo nuove risorse, sono in corso sperimentazioni che mirano a valutare se questi policheti carnivori possono essere usati per valorizzare i bivalvi di scarto. In questo contributo sono illustrati i primi risultati relativi a: 1) valutazione dell'attività dell'hallacromo su diversi microbi patogeni umani; 2) utilizzo di *H. carunculata* per il trattamento degli scarti di molluschi finalizzato al recupero e valorizzazione delle conchiglie.

Materiali e metodi - Gli esperimenti sono stati eseguiti con animali stabulati in laboratorio da almeno 6 mesi in un sistema di acquari a ricircolo (Simonini *et al.*, 2018). Gli esemplari di *H. parthenopeia* sono stati mantenuti in vaschette contenenti sabbia e alimentati regolarmente con bivalvi (*Ruditapes philippinarum* [A. Adams & Reeve, 1850]; *Chamelea gallina* [Linnaeus, 1758]; *Mytilus galloprovincialis* [Lamarck, 1819]). L'hallacromo, estratto secondo la procedura descritta in Simonini *et al.* (2019) e disciolto in DMSO 1% è stato testato su vari ceppi batterici Gram+ (*Listeria monocytogenes* NCTC1088, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC6538), Gram- (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC90279, *Escherichia coli* ATCC25922) e su funghi (*Candida albicans* 10231). La minima concentrazione inibente (MIC) è stata dedotta applicando la metodica "Disk diffusion" e "Agar Well Diffusion" con un intervallo di concentrazione compreso tra 0,07 mM e 7 mM. L'effetto dell'estratto è stato inoltre testato su biofilm di *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. monocytogenes* ed *E. faecalis* per 2, 6 e 24 ore, alle concentrazioni MIC e MICx2 identificate (Condò *et al.*, 2023). Esemplari di *H. carunculata* sono stati mantenuti in acquario senza sedimento con pesce e mitili decongelati (Simonini *et al.*, 2018). Negli esperimenti sono stati impiegati cestini di plastica galleggianti (repliche) in cui gruppi di vermi (di numero, biomassa [fb_i] e densità [FB_i, kg m⁻²] nota) erano alimentati con una quantità nota di mitili freschi per due settimane. I mitili, aperti manualmente tramite un coltello in modo da simulare bivalvi rotti di scarto, erano somministrati al martedì e venerdì, mentre i residui (polpa e conchiglie) erano rimossi al lunedì e venerdì. I residui di mitili sono stati tamponati con carta assorbente e pesati sia in toto sia dopo aver rimosso i residui di polpa, in modo da ottenere il peso della conchiglia. La somma del peso dei residui in toto (r_t) e della conchiglia (r_s) per ogni cestino sono state utilizzate per ottenere la quantità di polpa consumata e fornita per settimana e riferita al metro quadrato (MC e MP, rispettivamente). Il tasso di consumo e di fornitura di mitili sono stati calcolati come MC_R=MC/FB_i e MP_R=MP/FB_i, rispettivamente. Le relazioni tra il tasso di consumo e il tasso di fornitura sono state valutate con una regressione RMA con l'intercetta posta a 0.

Risultati - Le analisi microbiologiche hanno evidenziato che l'hallacromo non è efficace verso batteri Gram- mentre inibisce la crescita di alcuni batteri Gram+ e del fungo *Candida albicans* (Tab. 1). Alla concentrazione minima inibente, l'hallacromo è stato in grado di rimuovere quasi completamente il biofilm in formazione e quello formato sia da *C. albicans* sia da *Enterococcus faecalis*. Esperimenti con *H. carunculata* hanno evidenziato che questi policheti riuscivano a rimuovere efficacemente la polpa dalle conchiglie di *M. galloprovincialis*, lasciando pochissimi residui. Il consumo aumentava proporzionalmente con il tasso di somministrazione fino a mezzo chilo di polpa

di mitilo per chilo di verme alla settimana (regressione RMA dopo la rimozione degli outgroup: $MC_r = 0,982MP_r$, $R^2=0,986$, $p<0,0001$) (Fig 1). Entro questa soglia i vermocani lasciavano solo conchiglie macroscopicamente pulite, con il 98% del peso del residuo costituito da conchiglia.

Tab. 1 – Effetto dell'hallacromo sui microbi testati, espresso come minima concentrazione inibente (MIC). *Effects of hallacrome on the tested microbes in terms of minimum inhibent concentration (MIC).*

Specie	Gruppo	MIC [mM]
<i>Candida albicans</i>	Fungo	0,06
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram +	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	0,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gram +	0,125
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram +	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram -	>2
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	>2

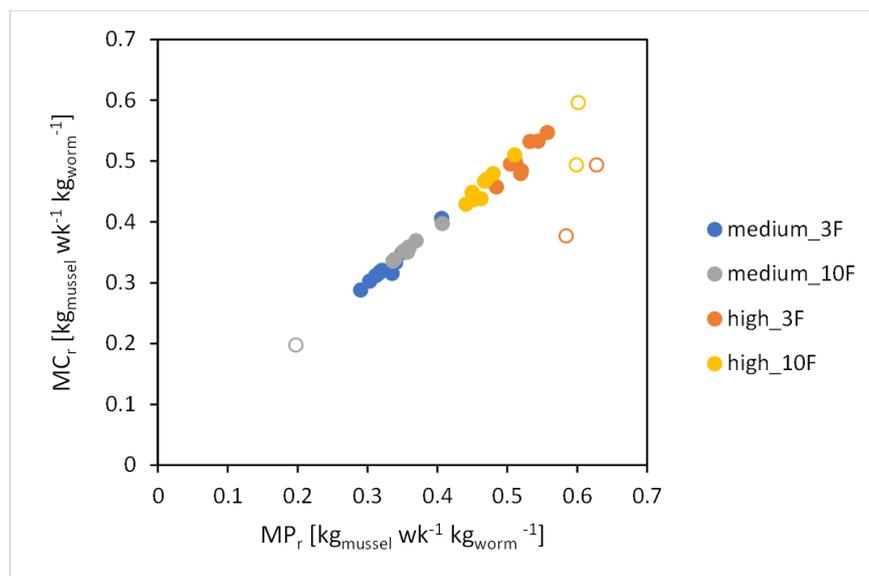


Fig. 1 - Relazione tra la fornitura di polpa di mitili MP_r e il tasso di consumo di mitili MC_r in repliche ($n = 40$) contenenti 3 (3F) o 10 (10F) vermocani alimentati con tassi di fornitura "medi" ($0,62 \text{ kg a settimana}^{-1} \text{ kgFBI}^{-1}$) o "alti" ($1 \text{ kg wk}^{-1} \text{ kgFBI}^{-1}$). I cerchi vuoti rappresentano outgroups (rimossi dalla regressione RMA). FBI=biomassa vermocani.

Relationship between the mussel meat provision MP_r and mussel consumption rate MC_r in replicates ($n=40$) containing 3 (3F) or 10 (10F) fireworms fed under "medium" ($0.62 \text{ kg wk}^{-1} \text{ kgFBI}^{-1}$) and "high" ($1 \text{ kg wk}^{-1} \text{ kgFBI}^{-1}$) whole mussel provision rates. The empty dots are outgroups (removed from the RMA regression). FBI= fireworm biomass.

Conclusioni –I risultati confermano che l'hallacromo estratto dal muco colorato di *H. parthenopeia* ha la capacità di inibire la crescita di microrganismi (Simonini *et al.*,

2019). Le differenze tra miceti e batteri Gram+, sensibili, e batteri Gram-, che mostravano resistenza, potrebbe essere riconducibile alla maggiore complessità strutturale della parete di questi ultimi. La capacità dell'hallacromo di agire sui biofilm di batteri Gram+, i valori di MIC minori di altri antrachinoni usati in medicina (Wei *et al.*, 2015), la sua forte attività contro alcuni patogeni umani e l'assenza di danni all'uomo in seguito a contatto diretto (Simonini *et al.*, 2019) suggeriscono che questa molecola potrebbe avere risvolti applicativi come antimicrobico. Per quanto riguarda *H. carunculata*, l'elevata efficienza nella rimozione selettiva della polpa dalle conchiglie e la possibilità di mantenerlo a densità molto elevate senza substrato potrebbe essere utile per valorizzare le conchiglie di rifiuto e sfruttare i gusci puliti come fonte di carbonato di calcio (Seesanong *et al.*, 2021). Trovare un impiego per questa specie invasiva potrebbe inoltre supportare interventi di rimozione da aree dove *H. carunculata* sta diventando infestante. Ulteriori indagini si focalizzeranno sullo sviluppo di un impianto in grado di sfruttare rifiuti marini per ottenere policheti utilizzabili come esche pregiate (*H. parthenopeia*), integratori alimentari per l'acquacoltura (*H. carunculata*) e fonti di molecole bioattive (entrambe le specie).

Ringraziamenti – Gli autori ringraziano Erika Soncini e Marta Zanotti per il supporto negli esperimenti e i revisori del manoscritto per gli utili suggerimenti. Le attività rientrano in Ecosister, un progetto finanziato nell'ambito del Programma Nazionale di Ripresa e Resilienza, Missione 04 Istruzione e ricerca – Componente 2 Dalla ricerca all'impresa Investimento 1.5 – NextGenerationEU, Avviso n. 3277 del 30/12/2021.

Bibliografia

- ARDUINI D., CALABRESE C., BORGHESE J., DE DOMENICO S., PUTIGNANO M., TOSO A., GRAVILI C., GIANGRANDE A. (2023) - Perspectives for Exploitation of *Sabella spallanzanii*'s Biomass as a New Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) By-Product: Feeding Trial on *Amphiprion ocellaris* Using Sabella Meal. *J. Mar. Sci. Eng.*, **11** (1): 123. DOI: 10.3390/jmse11010123
- CONDÒ C., ANFELLI I., FORTI L., SABIA C., MESSI P., ISEPPI R. (2023) - Lichens as a Natural Source of Compounds Active on Microorganisms of Human Health Interest. *Appl. Sci.*, **13** (3): 1976. DOI: 10.3390/app13031976
- POMBO A., BAPTISTA T., GRANADA L., FERREIRA S.M., GONÇALVES S.C., ANJOS C., SA E., CHAINHO P., CANCELA DA FONSECA L., FIDALGO E COSTA P., COSTA J.L. (2020) - Insight into aquaculture's potential of marine annelid worms and ecological concerns: a review. *Rev. Aquac.*, **12** (1): 107-121. DOI: 10.1111/raq.12307
- RIGHI S., FORTI L., SIMONINI R., FERRARI V., PREVEDELLI D., MUCCI A. (2022) - Novel Natural Compounds and Their Anatomical Distribution in the Stinging Fireworm *Hermodice carunculata* (Annelida). *Mar. Drugs*, **20** (9): 585. DOI: 10.3390/md20090585
- SEESANONG S., BOONCHOM B., CHAISEEDA K., BOONMEE W., LAOHAVISUTI N. (2021) - Conversion of Bivalve Shells to Monocalcium and Tricalcium Phosphates: An Approach to Recycle Seafood Wastes. *Materials*, **14** (16): 4395. DOI: 10.3390/ma14164395
- SIMONINI R., MALETTI I., RIGHI S., FAI S., PREVEDELLI D. (2018) - Laboratory observations on predator-prey interactions between the bearded fireworm (*Hermodice carunculata*) and Mediterranean benthic invertebrates. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, **51** (3): 145-158. DOI: 10.1080/10236244.2018.1502031
- SIMONINI R., IORI D., FORTI L., RIGHI S., PREVEDELLI D. (2019) - Ecotoxicity of hallachrome, an unusual 1-2 anthraquinone excreted by the infaunal polychaete *Halla parthenopeia*: evidence for a chemical defence? *Invertebr. Surviv. J.*, **16** (1): 84-91. DOI: 10.25431/1824-307X/isj.v0i0.84-91
- WEI Y., LIU Q., YU J., FENG Q., ZHAO L., SONG H., WANG W. (2015) - Antibacterial mode of action of 1, 8-dihydroxy-anthraquinone from *Porphyra haitanensis* against *Staphylococcus aureus*. *Nat. Prod. Res.*, **29** (10): 976-979. DOI: 10.1080/14786419.2014.964705