

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Centro Interdipartimentale di Ricerca per l'Acquacoltura

CRIAcq

DOTTORATO DI RICERCA IN ACQUACOLTURA

(INDIRIZZO IN PRODUZIONI MARINE E DULCIACQUICOLE)

IMPIANTI DI ACQUACOLTURA A CIRCUITO CHIUSO:

SISTEMA DI ALLEVAMENTO INTEGRATO

COORDINATORE

Ch.mo Prof.

Aldo Bordi

RELATORE

Ch.mo Prof.

Giovanni Melluso

DOTTORANDA

Dott.ssa Silvia Buono

dott.ssa

Anna Martello

Indice

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Introduzione	2
1.2 Scopo della ricerca	3
1.3 Inquinamento ambientale	3
1.4 Impianti d'acquacoltura a basso impatto ambientale: il circuito chiuso	5
1.5 Attività dei batteri coinvolti nei processi depurativi	6

Capitolo 2: Materiali e metodi

2.1 L'impianto a circuito chiuso del CRIAcq	12
2.1.1 Modulo per il trattamento dei reflui	15
2.2 Fase di avvio e di mantenimento dei biodischi	18
2.3 Caratterizzazione chimica dei reflui	20
2.3.1 Parametri chimico-fisici	20
2.3.2 Microchem Nutrients MP4	21
2.4 Microalghe	25
2.4.1 Preparazione terreno di coltura algale	26
2.4.2 Ceppi puri	27
2.4.3 Colture iniziali	27
2.4.4 Test di crescita algale	28
2.5 Valore nutrizionale delle microalghe accresciute nel refluo depurato	29
2.5.1 Carboidrati	30
2.5.2 Determinazione del contenuto in acidi grassi polinsaturi	32
2.6 Test di crescita di semi di <i>Mytilus galloprovincialis</i>	33

Capitolo 3: Risultati e discussioni

3.1 Parametri chimico-fisici	36
3.2 Anidride carbonica, alcalinità e BOD5	39
3.3 Analisi dei principali nutrienti presenti nel refluo	43
3.4 Recupero del refluo biotrasformato e Test di crescita algale	50
3.5 Correlazione tra il contenuto in nutrienti del refluo biotrasformato e crescita algale (<i>Tetraselmis suecica</i> e <i>Isochrysis galbana</i>)	59
3.6 Valore nutrizionale delle microalghe utilizzate nella sperimentazione	65
3.6.1 Acidi grassi	65
3.6.2 Proteine	70
3.6.3 Carboidrati	70
3.7 Test mitili	71
3.8 Contenuto nutritivo delle microalghe e accrescimento di <i>M. galloprovincialis</i>	82

Capitolo 4: Conclusioni

4.1 Conclusioni	86
-----------------	----

Bibliografia	87
---------------------	----

CAPITOLO 1

Introduzione

1.1 Introduzione

L'acquacoltura, attività che comprende l'allevamento di organismi acquatici vegetali ed animali, ha origini antiche e strettamente legate a quelle della pesca.

Tale settore comprende molte e diversificate pratiche di allevamento rispetto alle specie (alghe, molluschi, crostacei, pesci ed altri organismi acquatici), all'ambiente e ai sistemi utilizzati, offrendo un ampio ventaglio di possibilità per accrescere la produzione e il reddito in molte aree rurali e periurbane. La qualità dei prodotti è specchio delle modalità di allevamento, delle tecnologie impiegate e della risorsa idrica utilizzata.

Un continuo processo di evoluzione ha portato oggi ad un'*acquacoltura* che ha lo scopo di produrre per soddisfare la crescente domanda che la pesca non può coprire.

Negli ultimi anni tale settore ha avuto un notevole sviluppo nella Comunità Europea facendo registrare una produzione nel 2003 pari a 2.204 milioni di tonnellate (FAO).

La produzione nazionale, registrata in Italia nel 2003, è stata di 192.000 (FAO) tonnellate prendendo in considerazione la produzione piscicola di acque dolci, marine e salmastre.

In acquacoltura la ricerca scientifica e tecnologica sta lavorando alacremente oltre che per ampliare la gamma delle specie allevabili e per migliorare la qualità dei prodotti, anche per ridurre l'impatto ambientale che questo tipo di attività produttiva può generare.

Le aspettative produttive ed economiche del settore sono molte, ma si sono evidenziati anche numerosi aspetti negativi, specialmente dove tale attività è stata svolta in maniera poco responsabile (Cataudella, 2001).

L'acquacoltura è un'attività zootecnica intensiva e in quanto tale interagisce strettamente con l'ambiente utilizzando risorse naturali e causando mutamenti ambientali; l'immissione nell'ambiente acquatico di reflui caratterizzati da elevate quantità di nutrienti non consumati (Ackefors e Enell, 1990; Munday *et al.*, 1992; Pillay, 1992) contribuisce all'inquinamento delle acque (eutrofizzazione) e incrementa notevolmente i costi di produzione.

L'impatto ambientale negativo dell'acquacoltura è controllato e mitigato da una serie di norme e/o patti intesi a prevenire il degrado ambientale, inoltre anche la ricerca scientifica e lo sviluppo tecnologico possono fornire contributi positivi per prevenire o addirittura annullare gli effetti sull'ambiente, che spesso rappresentano per le aziende produttive barriere insormontabili nell'acquisizione di cessioni di aree costiere, da dedicare a tale attività.

1.2 Scopo della Ricerca

Obiettivo della ricerca è stato porre l'attenzione sul recupero e trattamento biologico dei reflui provenienti da un impianto d'acquacoltura mediante l'applicazione innovativa di un sistema a biodischi rotanti. La ricerca si è svolta presso l'impianto di acquacoltura del CRIAcq, un impianto pilota a circuito chiuso realizzato per la riproduzione e l'allevamento di specie ittiche, in cui il modulo "trattamento reflui" costituisce la massima espressione tecnologica nella sua innovativa applicazione.

La ricerca si propone di dimostrare come mediante l'applicazione di questa tecnica è possibile recuperare totalmente i reflui provenienti dalle vasche di allevamento e, dopo opportuno trattamento, riutilizzarli come terreno di coltura per la crescita di microalghe, organismi indispensabili nella catena alimentare dei pesci.

L'energia recuperata è stata quindi utilizzata per la produzione di fitoplancton (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*), la cui capacità nutrizionale è stata verificata mediante analisi chimiche e l'applicazione di un sistema di allevamento integrato.

A tal fine è stata valutata l'efficacia del suddetto sistema di depurazione mediante la caratterizzazione chimica e biologica del refluo e l'applicazione di un sistema di allevamento integrato.

1.3 Inquinamento ambientale

L'inquinamento che l'acquacoltura arreca all'ambiente (fiumi, laghi, mare compresi gli estuari) consiste nell'introduzione diretta od indiretta in esso di sostanze o di energia che causano effetti nocivi quali il danneggiamento di risorse biologiche, rischi per la salute pubblica, ostacoli ad altre attività, compresa la pesca, alterazione della qualità dell'acqua marina dal punto di vista della sua utilizzazione e degrado del suo valore estetico. Le sostanze inquinanti rilasciate dagli impianti di piscicoltura negli ambienti acquatici recettori sono rappresentate prevalentemente da mangime non consumato, per lo più costituito da proteine, carboidrati, vitamine e pigmenti.

Il mangime somministrato ai pesci, consumato per il 90%, viene poi digerito ed escreto (escreto solubile ed escreto solido); il rimanente 10%, considerando una corretta alimentazione manuale, non è consumato (Penczak *et al.*, 1982; Hagopian e Riley, 1998) (figura 1 A). I rifiuti provenienti dall'allevamento comprendono, inoltre, composti organici ed inorganici come l' urea, i fosfati ed i composti azotati; possono essere rilasciati anche

residui di sostanze utilizzate a scopi profilattici o terapeutici (antibiotici o disinfettanti), ma la frazione relativa al mangime non consumato è quella preponderante.

L'assimilazione di C, N e P avviene secondo percentuali desunte da diversi lavori di ricerca specifici per varie specie. In figura 1 B vengono riportate le percentuali d'escrezione di N e P riprese dalla letteratura sull'orata (Porter *et al.*, 1987; Krom e Neori, 1989), quelle per il C solubile e solido dalla letteratura sul salmone.

Rispetto agli allevamenti terrestri, i cui scarti non raggiungono direttamente i corpi idrici recettori, gli impianti di acquacoltura in mare possono creare impatti più diretti sugli ambienti acquatici, per la localizzazione delle unità di produzione negli stessi.

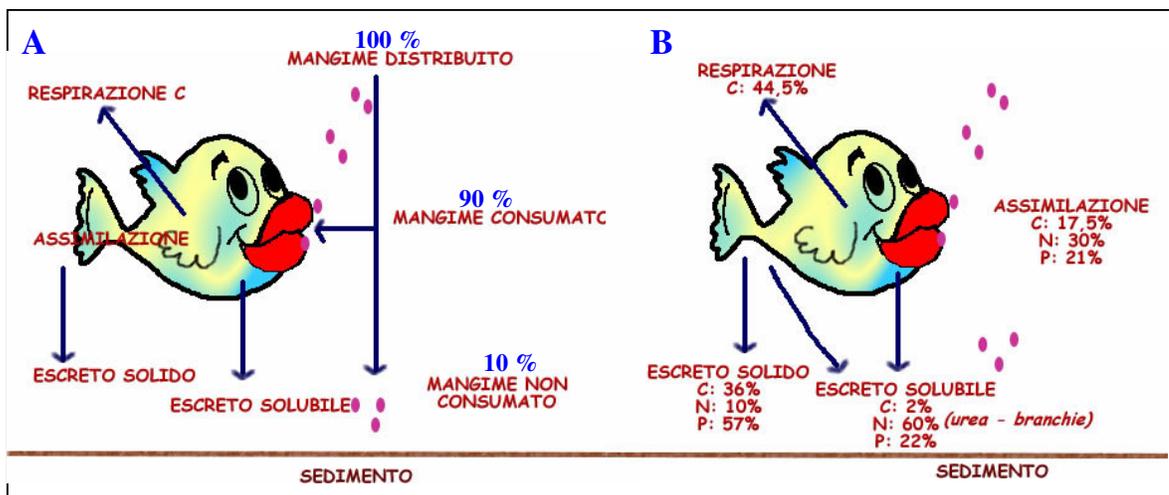


Figura 1 A. Tragitto del mangime somministrato al pesce (assimilazione), all'acqua (escreti solubili) e al sedimento (escreti solidi). **B.** Percentuali di azoto e fosforo escreto ed assimilato da pesci allevati.

L'incidenza del rischio biologico dei sistemi di allevamento intensivo è più alta rispetto alle altre forme di allevamento a causa dell'alto numero di animali allevabili per unità di superficie; infatti ciò comporta una quantità elevata di reflui prodotti cosicché la "gestione" degli escreti animali è da tempo un problema scottante per l'acquacoltura e in generale per tutte le attività zootecniche. Il rapporto fra attività umana e qualità dell'ambiente è la storia di una conflittualità per molto tempo considerata ineluttabile.

La dimensione dei problemi posti dalle molteplici forme di inquinamento investe, anche e non marginalmente, l'acquacoltura. Gli allevatori sono stati costretti a prendere coscienza del problema riducendo l'impatto ambientale determinato dai loro allevamenti, applicando scelte gestionali responsabili e utilizzando nuovi sistemi tecnologici di depurazione, la cui corretta applicazione favorisce il riciclo dell'acqua che è poi rilasciata.

L'opinione pubblica è sempre più attenta ai problemi legati all'inquinamento, compreso quello causato dalle ittiocolture i cui reflui, paragonati agli scarichi urbani o ad altri settori della zootecnica e dell'agricoltura, hanno un'incidenza minore.

Per considerare un insediamento produttivo tecnicamente valido ed economicamente supportabile dall'ente pubblico, non si dovrebbe prescindere dall'impatto che esso causa nell'ambiente circostante in termini di inquinamento chimico, acustico, olfattivo o di ogni altro tipo.

1.4 Impianti d'acquacoltura a basso impatto ambientale: il circuito chiuso

Le relazioni tra acquacoltura e ambiente sono di estrema importanza, per cui nasce la necessità di una produzione che tenga conto sia della *ecocompatibilità* del processo produttivo utilizzato, che della sua *ecosostenibilità*.

In Italia il 70% delle produzioni ittiche di allevamento proviene da impianti di acquacoltura intensivi, basati sull'allevamento monospecifico di specie di elevato pregio quali spigola e orata.

Si sono sviluppate numerose metodologie per il trattamento dei reflui, che hanno come scopo principale l'allontanamento di sostanze nutritive (azoto e fosforo) al fine di evitare fenomeni di eutrofizzazione delle acque utilizzate e quindi dei corpi idrici recettori.

Le soluzioni possono essere differenti: la più diffusa e utilizzata in ambito produttivo consiste nell'installazione di filtri meccanici per la rimozione del sedimento e di filtri biologici agenti sulla trasformazione e sulla fissazione delle sostanze organiche disciolte.

Nella direzione di uno sviluppo ecosostenibile, una parte del settore scientifico ha rivolto la sua attenzione agli impianti d'acquacoltura intensivi a ricircuitazione idrica.

In tali impianti la depurazione e il riutilizzo delle acque di allevamento non solo riducono il consumo della risorsa idrica ma, riducendo il rilascio di reflui nell'ambiente, rendono minimo l'impatto ambientale.

Non bisogna dimenticare che il carico ittico è generalmente dimensionato sulla base della disponibilità quantitativa e qualitativa dell'acqua di ricambio e sempre più frequentemente le Amministrazioni centrali e locali emanano regolamenti e leggi che incoraggiano un reimpiego dei reflui delle attività produttive, piuttosto che l'incremento della captazione.

Per prevenire tale depauperamento, la legislazione comunitaria e nazionale in materia di acque ha posto l'attenzione sul problema del riutilizzo delle acque reflue verso settori che

necessitano di consistenti volumi d'acqua, ma che non ne richiedono l'elevata qualità, come ad esempio l'agricoltura.

In Italia il D.L. 11 maggio 1999, n. 152 – disposizioni correttive ed integrative a tale D.L. sono riportate nel D.L. 18 agosto 2000 n. 258 - definisce la disciplina generale per la tutela delle acque superficiali, marine e sotterranee perseguendo numerosi obiettivi tra cui l'individuazione di misure tese alla conservazione, al risparmio, al riutilizzo ed al riciclo delle risorse idriche.

L'utilizzazione degli impianti a “circuito chiuso“ è legata a svariati fattori, quali la riduzione dell'impatto ambientale, il maggior controllo sulle caratteristiche di produzione, la minore richiesta di acqua, maggior profitto.

Il problema maggiore che le aziende d'acquacoltura incontrano è legato all'alto investimento necessario per la progettazione e la costruzione degli impianti, investimento che viene però recuperato a fronte delle alte produzioni ottenute.

1.5 Attività dei batteri coinvolti nei processi depurativi

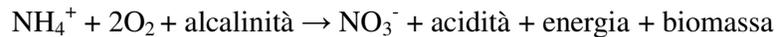
Il filtro biologico costituisce il fulcro fondamentale della depurazione delle acque reflue in quanto riesce ad ottenere rendimenti di depurazione che si avvicinano al 95-96%, permettendo l'ossidazione aerobica di cataboliti azotati, quali ammoniaca e nitriti, a nitrati (Wheaton *et al.*, 1991; Hagopian e Riley, 1998). Con il termine “nitrificazione” si intende l'ossidazione biologica dei composti inorganici dell'azoto (NH_4^+ e NO_2^-) ad opera di batteri nitrificanti. Tradizionalmente il processo di nitrificazione viene valutato mediante misure chimiche quantitative inerenti la riduzione del contenuto in ammoniaca o nitriti del substrato (Hovanec e DeLong, 1996). La nitrificazione avviene in un ampio range di ambienti: suolo, acqua dolce, ambiente marino e reflui.

A dispetto della loro importanza e rilevanza ben poco è noto circa l'identità e l'ecologia dei microorganismi coinvolti nei processi di ossidazione dell'N in questi sistemi (van Rijn, 1996; Tal *et al.*, 2003).

L'ossidazione dell'azoto ammoniacale (N-NH_4^+) determina la formazione dell'azoto nitrico (N-NO_3^-) mediante la formazione di un prodotto intermedio, l'azoto nitroso (N-NO_2^-). Siccome l'azoto ammoniacale e l'azoto nitroso risultano tossici per gli organismi acquatici è necessario un loro abbattimento prima dell'emissione o del riutilizzo delle acque.

I batteri coinvolti nei processi di nitrificazione, comunemente detti nitrificanti, sono batteri autotrofi chemiolitotrofi che ottengono l'energia necessaria al proprio metabolismo da

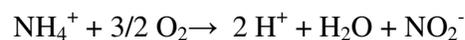
fonti inorganiche come lo ione ammonio che rappresenta la principale sorgente sia per l'azoto che per l'idrogeno, mentre le principali fonti di carbonio sono costituite dai carbonati e dai bicarbonati, mentre per l'idrogeno altre fonti disponibili sono l'aria e l'acqua. La nitrificazione può essere spiegata nell'unica reazione:



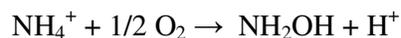
Il processo ossidativo si svolge però in due stadi (Suzuki *et al.*, 1974). Come detto in precedenza, il primo passaggio prevede l'ossidazione dell'ammonio a nitrito (nitrosazione) passando per l'intermedio idrossilammina (NH_2OH). Tale processo avviene ad opera di diversi ceppi batterici indicati in modo generico come nitrosanti, e tra i quali è possibile ricordare: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosocystis*, *Nitrospira* e *Nitrosogloea*.

Tra questi, *Nitrosomonas* risulta quello più importante e il più comunemente coinvolto. A questo genere appartengono due delle specie nitrosanti più diffuse: *Nitrosomonas europaea* (Hovanec e DeLong, 1996; Saroglia, 2001) e *Nitrosomonas cryotolerans* (che risultano essere strettamente associate ai sistemi marini) (Tal *et al.*, 2003).

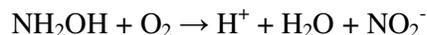
L'ammoniaca, come ione ammonio, viene ossidata a nitrito, con trasferimento di 6 elettroni:



Il processo avviene in due tappe: la prima fase è dovuta a una monossigenasi che, usando l' O_2 come ossidante, inserisce un O in NH_3 :



L'idrossilammina viene poi ossidata dall'idrossilamminadeidrogenasi, un enzima citoplasmatico complesso:



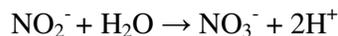
Il molibdeno nella reazione funge da catalizzatore.

Questo primo esogeno processo di ossidazione produce quattro volte più energia (84 kcal mol^{-1}) del processo ossidativo del nitrito ($17,8 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Gibbs e Schiff, 1960).

Tale processo, che risulta irreversibile, produce inoltre acidità e consuma ossigeno. La frazione di azoto ammoniacale totale ($\text{NH}_3\text{-N} + \text{NH}_4\text{-N}$), presente come ammoniaca (ppm di NH_3) dipende strettamente dal pH e dalla temperatura (Anthonisen *et al.*, 1976).

Una volta che sia stato prodotto lo ione nitrito, entra in gioco la seconda classe di batteri che, fino a questo momento, è stata del tutto latente per mancanza di substrato su cui operare.

Il secondo processo ossidativo, catalizzato dall'enzima nitritoossidasi, comporta la trasformazione dell'azoto nitroso in azoto nitrico (nitrificazione) secondo la reazione:



I batteri principalmente coinvolti in questo secondo passaggio ossidativo sono indicati come nitrificanti e i maggiori rappresentanti sono *Nitrobacter*, *Nitrospira* e *Nitrocystis*. La specie più diffusa del genere è *Nitrobacter winogradskyi*.

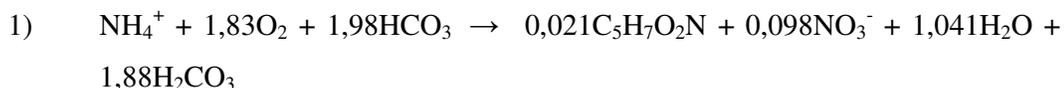
In realtà anche sui batteri coinvolti in questo processo c'è molta confusione; infatti altri studi hanno dimostrato che i batteri coinvolti nel processo ossidativo del nitrito sia in acqua dolce che in acqua di mare apparterebbero alla specie *Nitrospira sp.* (Smith *et al.*, 2001) e non *Nitrobacter sp.* come prima riportato (Burrell *et al.*, 1998; Daims *et al.*, 2000).

Come il primo processo anche questa seconda reazione è possibile solo in ambiente aerobico, ma a differenza del primo è un processo reversibile, infatti in condizioni di anossia si verifica il passaggio inverso (riduzione).

L'azoto ammoniacale e nitroso risulta tossico non solo per i pesci ma anche per gli stessi batteri nitrificanti, infatti è riportato in letteratura che l'attività nitrificante di tali batteri risulta essere estremamente bassa in presenza di elevate quantità di ioni ammonio e nitrito (Bower e Turner, 1983; Yang *et al.*, 1995; Sakairi *et al.*, 1996).

La tossicità dell'ammoniaca indissociata per le specie del genere *Nitrosomonas* risulta compresa tra 10-150 ppm, mentre *Nitrobacter* è più sensibile (0,1 ppm); in acqua dolce l'azoto nitroso risulta tossico a 1 ppm (Saroglia, 2001).

La sola fonte di carbonio per la sintesi della biomassa nitrificante è rappresentata dai carbonati e dai bicarbonati, i quali entrano nella reazione secondo le seguenti equazioni:



Perché queste reazioni avvengano è necessario l'instaurarsi di specifici equilibri stechiometrici (tabella I).

Tabella I. Equilibrio stechiometrico calcolato per l'ossidazione completa di un grammo di azoto ammoniacale secondo le reazioni 1) e 2) sopra riportate.

Composto	(1)		(2)	
	Consumato (g)	Prodotto (g)	Consumato (g)	Prodotto (g)
O₂	4,18		4,33	
H⁺		1,98		1,98
CaCO₃ (alcalinità)	7,14		7,14	
C₅H₇O₂N (cellule)		0,17		
CH₂O (cellule)				0,21
N-NO₃⁻		4,34		4,43
H₂O		1,34		3,73
H₂CO₃		8,59		
CO₂				5,97

L'ossidazione dell'azoto ammoniacale determina quindi una riduzione dell'alcalinità carbonatica, con produzione di nitrato, protoni, cellule batteriche, acqua, acido carbonico. Il pH del sistema si abbassa in seguito alla produzione di protoni, e se non viene regolarmente controllato si porterà su valori incompatibili con la buona attività del biofiltro (Summerfelt e Sharrer, 2004). Il tempo medio di generazione dei batteri nitrificanti è di circa 10-12 ore ed è in relazione con la concentrazione del substrato disponibile nel sistema (Saroglia, 2001).

Le attività nitrificanti sono esaltate dalle alte temperature mentre le basse temperature, sebbene non arrestano il processo, ne determinano un rallentamento. Il range termico utile allo sviluppo dei nitrificanti è compreso tra 4-45°C, l'optimum invece è tra 25-35°C. A parità di condizioni generali, il rendimento delle specie batteriche presenti nei biofiltri sarà maggiore quindi in condizioni termofile piuttosto che in psicrofilia. Il pH e l'alcalinità carbonatica sono i parametri che influenzano maggiormente l'efficienza dei nitrificanti. Relativamente al primo fattore, il range di tolleranza è compreso tra 6-9, ma possono resistere a valori di pH estremi (5-10); l'optimum è ottenuto in ambiente neutro-alcalino (7-8) (Painter, 1970; Jones e Paskins, 1982; Kumar e Nicholas, 1983). L'efficienza si riduce quando il pH scende sotto 7.

L'ossigeno disciolto è il fattore limitante più facilmente controllabile; una regolare attività di nitrificazione viene garantita da una concentrazione pari a 5-6 mg/l, mentre il processo viene inibito a concentrazioni inferiori a 0,2 mg/l. La concentrazione dei sali disciolti non

ha una grande incidenza sull'efficienza dei nitrificanti; i batteri tollerano infatti variazioni di salinità fino a 5 g/l. Nei biofiltri si dovrà provvedere alla copertura con materiale oscurante per evitare che la luce, ossidando il citocromo-C batterico, inibisca lo sviluppo dei nitrificanti in particolare di Nitrobacter (Johnstone e Jones, 1988; Diab e Shilo, 1988; Hagopian e Riley, 1998). Vengono utilizzati come supporto per lo sviluppo batterico, di solito, materiali di origine naturale come rocce, sabbia o ghiaia, o prodotti di sintesi come sfere di plastica, spugne di poliuretano. Tra questi vi sono materiali che hanno uno sviluppo superficiale che varia da 80 a 400 m²/m³ e sono definiti a “bassa densità”, mentre altri ad “alta densità” hanno uno sviluppo superficiale da 400-2000 m²/m³ (Saroglia, 2001).

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

2.1. L'impianto pilota a circuito chiuso del CRIAcq

Descrizione tecnica

L'impianto pilota a circuito chiuso, installato presso il CRIAcq grazie ad un finanziamento POR-Regione Campania mis. 4.23, è stato progettato in diversi moduli, ognuno dei quali svolge funzioni specifiche e ha una propria autonomia strutturale e funzionale. L'impianto progettato è una avannotteria e risulta articolato in moduli al fine di attuare un sistema di allevamento integrato:

- Moduli a ricircolo per la stabulazione e il condizionamento di riproduttori di orata

I due moduli utilizzati per la stabulazione dei riproduttori (figura 3 A), sono stati realizzati per sperimentazioni su *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*. Ogni vasca ha un volume netto di 3,5 m³. La depurazione delle acque è effettuata mediante un sistema articolato di filtri meccanici (filtro a sabbia) e biologici, che permettono l'abbattimento delle sostanze organiche.

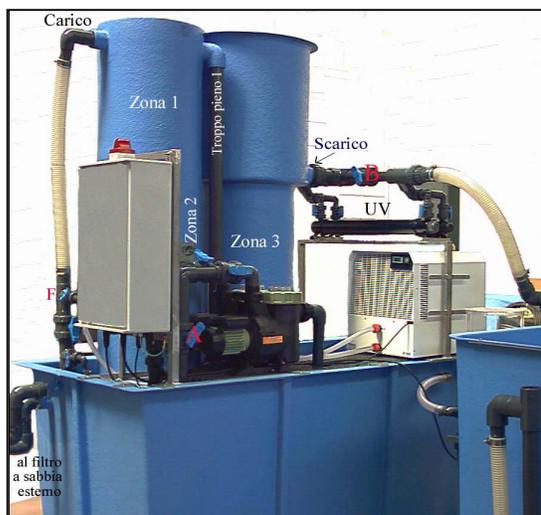


Figura 2. Sistema di filtrazione biologica applicato al modulo.

Il sistema di biofiltrazione risulta composto da tre zone distinte ma non separate (figura 2):

1. zona con filtro percolatore
2. colonna di degasazione (filtro sommerso);
3. zona a filtro galleggiante

- Modulo a ricircolo per pre-ingrasso

Il modulo a ricircolo per avannotteria è costituito da quattro vasche ciascuna con capacità unitaria di 1000 litri. Il modulo (figura 3 B) è completamente autonomo è dotato di un proprio impianto di depurazione delle acque caratterizzato da un sistema articolato di filtri meccanici e biologici come descritto per il modulo di stabulazione dei riproduttori.

- Modulo per le prove di schiusa e alimentazione larvale

Tale modulo (figura 3 C) risulta costituito da 10 vasche cilindriche con fondo conico in vetroresina multistrato, ciascuna con capacità di circa 20 litri. L'acqua prima di arrivare alle vaschette subisce un processo di depurazione biologico e meccanico.

- Modulo di allevamento molluschi e prove di crescita del fitoplancton

Il modulo (figura 3 D) è costituito da quattro vasche, ciascuna con capacità unitaria di 1000 litri, di cui due per l'allevamento dei molluschi e due per prove di crescita algale. L'acqua delle vasche di molluschicoltura proviene da un serbatoio esterno e non subisce alcun trattamento di depurazione, data la capacità filtrante e depurativa degli stessi organismi allevati.

- Modulo per produzione e riproduzione del fitozooplancton

Il modulo per la produzione di fito e zooplancton (figura 3 E) in piccoli volumi è costituito da due scaffalature in acciaio inox, che presentano 10 ripiani su cui sono alloggiati 30 contenitori in vetro robusto dalla capacità di 10 litri. L'impianto di illuminazione è formato da 5 gruppi di due lampade fluorescenti fitostimolanti. Il modulo di riproduzione di fitoplancton e zooplancton (Figura 3 E) è costituito da 10 contenitori cilindrici trasparenti in polietilene con maglia di rinforzo plastificata, ciascuna con basetta in vetroresina. Ciascun contenitore è esposto a lampade fluorescenti fitostimolanti. Mediante una pompa l'acqua viene inviata a una serie di filtri a cartuccia, che presentano una capacità di filtrazione crescente da 60 fino a 1 μm ; in successione si trova un impianto di sterilizzazione a raggi UV.

A



B



C



D



E



Figura 3: A. Modulo per la stabulazione dei riproduttori
B. Avannotteria
C. Modulo per prove di schiusa e alimentazione larvale
D. Mitilicoltura
E. Modulo di produzione e riproduzione di fito-zooplanton

2.1.1 Modulo per il trattamento dei reflui

Le dimensioni massime di ingombro del modulo (figura 4, 7) sono 4,5 l x 1,1 p x 2,6 h m. Le acque di scarico provenienti dalle diverse vasche di allevamento sono convogliate nell'impianto di trattamento dei reflui, che è stato progettato per essere in grado di trattare un carico organico massimo di circa 2 kg al giorno di BOD5 .

Il modulo è costituito da una serie di vasche in successione, realizzate in vetroresina, ognuna delle quali svolge una funzione specifica.



Figura 4. Modulo di depurazione a biossidi.

Nella vasca di equalizzazione i reflui, provenienti dai sedimentatori e dagli schiumatoi dei diversi moduli, sono sottoposti ad agitazione con velocità variabile e regolabile a seconda delle esigenze. Per troppo pieno, il refluo passa in una vaschetta e quindi alla vasca di sedimentazione.

Dal sedimentatore per troppo pieno il refluo raggiunge la vasca di ossidazione biologica, a pianta rettangolare a sezione trasversa semicircolare e trapezoidale, in cui è alloggiato un rotore a biossidi, costituito da pacchi di biossidi in polietilene alta densità di colore nero con superficie particolarmente ruvida per agevolare l'attacco della biomassa filtrante. Tali biossidi risultano sorretti da un albero centrale.

Il rotore a biossidi ha un diametro massimo di 700 mm; inoltre è immerso per circa il 40% del suo diametro nel liquame da trattare ed ha una velocità di rotazione che è stata impostata a circa 2 giri al minuto, variabile e regolabile. L'albero infatti è fatto ruotare lentamente così che i dischi vengano ad avere le superfici esposte alternativamente all'aria

e al liquame. I biodischi sono spazati in modo tale che durante l'immersione il liquame possa entrare e bagnare le superfici dei dischi, e durante le emersioni, possa avvenire l'ossigenazione della biomassa attaccata ai dischi (figura.6). Il flusso è regolato in modo tale che il tempo di ritenzione del refluo è di circa 20 ore.

Ogni biodisco opera come un reattore a se stante, in cui la crescita della biomassa e il suo



Figura 5. Particolare del biofilm sui biodischi

distacco dal mezzo plastico sono in una condizione di equilibrio dinamico. Sui biodischi è stato in grado di svilupparsi uno strato di biomassa (biofilm) dello spessore di 1-2 mm, consentendo di operare con un tempo di ritenzione del refluo di circa 20 h.

Si è osservato che la pellicola biologica (figura 5) sviluppata si distacca

autonomamente dalla superficie del disco grazie all'azione di taglio indotta

dalla resistenza all'avanzamento del disco stesso nella miscela liquida. La miscela liquida in cui s'immergono i dischi viene mantenuta in agitazione dal movimento degli stessi e viene così impedita la sedimentazione dei solidi sospesi, nel contempo la miscelazione consente la distribuzione dell'ossigeno accumulato dai dischi nella fase di emersione in tutta la massa liquida della vasca (Masotti, 1987; Ramadori e Tandoi, 2003).

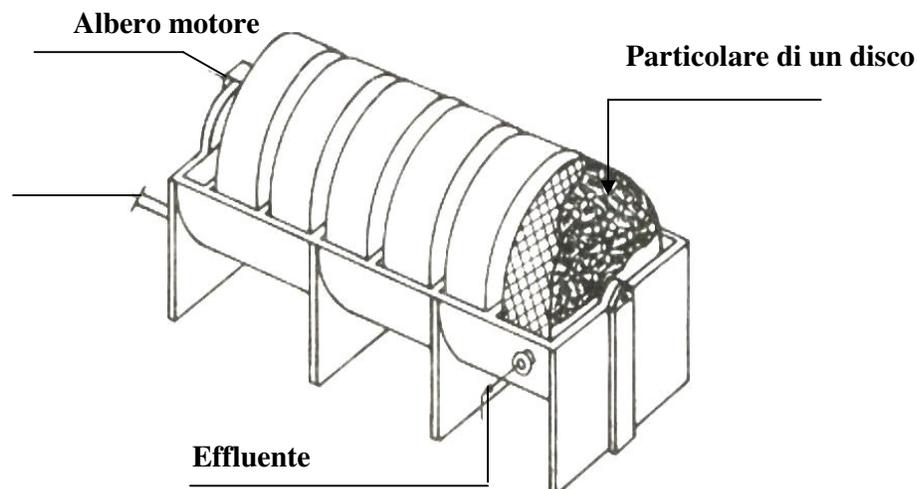


Figura 6. Schema di un impianto d'ossidazione a biodischi rotanti



Figura 7. Modulo di depurazione

L'intera vasca dove sono alloggiati i biodischi è protetta da una copertura che evita la crescita delle alghe, assicura una buona coibentazione e protegge la flora batterica nitrificante dalla luce, che sembra inibire la citocromo ossidasi.

Mediante pompa il refluo viene immesso in una serie di vaschette riempite con spugne di poliuretano espanso (figura 7), fino a raggiungere per troppo pieno una vasca contenente lo schiumatoio. Da qui si procede con un trattamento biologico aggiuntivo costituito da filtro percolatore e filtro a letto fluido.

Dopo sterilizzazione con lampade a raggi UV, la soluzione biotrasformata così ottenuta è stata utilizzata per effettuare prove di crescita algale.

Con questo processo si sono formati prodotti, detti di mineralizzazione che si accumulano nell'acqua; si tratta di sostanze nocive alla vita dei pesci e che vengono utilizzate dai vegetali come nutrimento.

Durante la sperimentazione il modulo è stato modificato al fine di permettere una buona depurazione del refluo ed aumentare lo sviluppo della biomassa filtrante sui biodischi.

Le modifiche apportate sono consistite nel rimuovere lo schiumatoio e nell'eliminare il filtro biologico percolatore e quello a letto fluido; la rimozione delle suddette componenti è stata effettuata in quanto il modulo risultava sovradimensionato rispetto al contenuto organico del refluo trattato in questa sperimentazione.

2.2 Fase di avvio e di mantenimento dei biodischi

Nella fase iniziale, successiva al montaggio dell'impianto, i moduli sono stati riempiti con acqua dolce per un periodo di un mese per consentire l'allontanamento dei residui derivanti dai materiali di montaggio, per definire i livelli idraulici di equilibrio del modulo e per collaudare le pompe ed i sistemi meccanico-impiantistici.

Prima dell'introduzione del refluo nel modulo è stato necessario effettuare una fase di disinfezione mediante ipoclorito, garantendo una concentrazione di cloro attivo di circa 400 ppm e lasciandolo agire per un periodo di 24 ore.

Dopo questa fase di pulizia il modulo è stato sciacquato e svuotato di tutto il suo contenuto, al fine di allontanare ogni traccia di cloro. Effettuata la disinfezione, il modulo è stato riempito con acqua marina e si è proceduto con la formazione del filtro biologico.

I reflui prodotti dal nostro impianto, sono stati integrati mediante reflui provenienti da altri impianti d'acquacoltura.

Per accelerare la maturazione del filtro biologico sono stati introdotti nel sistema alcuni sali per m³:

- 16 gr di cloruro di ammonio (NH₄Cl)
- 4 gr di nitrito di sodio (NaNO₂).

Dopo una settimana è stato aggiunto cloruro di ammonio riportando la concentrazione di ammonio a 4 ppm e controllando che tale concentrazione restasse costante per 15 giorni. Alla terza settimana sono stati controllati mediante Microchem Nutrients MP4 i nitriti, che sono stati riportati ad una concentrazione pari a 4 ppm, mentre la settimana successiva il circuito è stato svuotato dell'acqua e riempito con acqua nuova e trattata con raggi U.V.

Durante questa fase di avvio si è proceduto con l'introduzione di 1 ml di inoculo batterico (Aqua Bacta Aid – A.B.A- contenente sette ceppi batterici latenti, nitrificanti e non, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas biazotea*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter winogradskyi*, *Rhodopseudomonas palustris*) per ogni 400 litri d'acqua.

La scelta dell'inoculo è stata effettuata in base alle sue caratteristiche peculiari:

- riduce la quantità di sostanza organica presente;
- riduce i solidi in sospensione, le feci e l'alimento non consumato;
- favorisce l'ossidazione dell'azoto ammoniacale e dell'azoto nitrico;
- consente una oscillazione dei livelli dell'ossigeno più controllata;

- controlla le alghe e migliora la qualità dell'acqua;
- bilancia i microorganismi;
- riduce lo sviluppo delle alghe verdi-azzurre e la carica batterica nociva.

Il sistema è stato areato per 7-10 giorni. Dopo 72 ore il trattamento è stato ripetuto. L'applicazione dell'inoculo è stata effettuata settimanalmente nel tardo pomeriggio poichè l'inizio dell'oscurità favorisce la crescita dei batteri rispetto alle alghe verde-azzurro.

Effettuata la fase di avvio dei biodischi si è proceduto con l'introduzione dei reflui.

La tabella II indica la quantità e la provenienza dei reflui integrati e la frequenza con cui sono stati immessi nel sistema.

Tabella II. Periodo, quantità, frequenza e provenienza dei reflui introdotti nel depuratore a biodischi

<i>Mesi</i>	<i>Provenienza refluo</i>	<i>Quantità</i>	<i>Frequenza</i>
Gennaio – Febbraio – Marzo 2004	ECOM – impianto <i>in-shore</i> di ingrasso di spigole e orate e depurazione mitili	1kg	giornaliera
	Mangime	100 g	bisettimanale
Aprile – Maggio – Giugno 2004	ECOM – impianto <i>in-shore</i> di ingrasso di spigole e orate e depurazione mitili	1kg	giornaliera
	Mangime	200 g	bisettimanale
Luglio 2004	Sali: NH ₄ Cl e NaNO ₂	*	*
Agosto – Settembre 2004	Sali: NH ₄ Cl e NaNO ₂	*	*
	Mangime	100 g	bisettimanale
Ottobre – Novembre – Dicembre 2004	Panittica pugliese – impianto <i>in-shore</i> di spigole, orate, ecc.	6 litri	giornaliera
	Mangime	200 g	trisettimanale
Gennaio - Febbraio 2005	Panittica pugliese – impianto <i>in-shore</i> di spigole, orate, ecc.	6 lt	giornaliera
	Mangime	200 g	trisettimanale

* Come da fase di avvio riportata nel par. 2.2

2.3 *Caratterizzazione chimica dei reflui*

Per verificare il funzionamento e l'efficienza del depuratore a biodischi si è proceduto effettuando con cadenza settimanale un monitoraggio chimico-fisico dei reflui in ingresso ed in uscita dal depuratore. Il tempo di ritenzione del refluo nel sistema è stato di 20 ore, per cui il campione in uscita è stato prelevato 20 ore dopo il campione d'ingresso per determinare l'abbattimento di alcuni parametri chimici. Le analisi chimiche effettuate per determinare la formazione del biofilm sui rotori ed il suo grado di sviluppo sono state:

- monitoraggio dei principali parametri fisici (T°, pH, salinità, O₂);
- BOD₅ (Metodo ufficiale riportato sulla *Gazzetta ufficiale n. L 383 del 29/12/1992 pag. 0113 – 0115* - Direttiva 92/69/CEE della Commissione, del 31 luglio 1992, recante diciassettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio);
- alcalinità (Phenolphthalein and total Method Approved by Standard Methods Committee, 1997);
- CO₂ (Titration using Sodium Hydroxide - Booth, 1995)
- NH₃⁺, NO₃⁻, NO₂⁻
- PO₄³⁻

2.3.1 *Parametri chimico-fisici*

I parametri chimico-fisici valutati nella vasca di equalizzazione del depuratore a biodischi con cadenza giornaliera sono stati: temperatura, pH, ossigeno disciolto e salinità. La determinazione della temperatura riveste notevole importanza per quel che riguarda l'influenza sulla flora batterica. La determinazione è stata effettuata tramite l'utilizzo del sensore termico del pH-metro (HACH sensION 156) e il sensore termico dell'ossimetro (OXYCON), immergendo le sonde direttamente nella vasca di equalizzazione.

Il pH è un parametro molto importante, infatti variazioni di quest'ultimo esercitano la loro azione influenzando la capacità degli organismi di assumere ossigeno. Inoltre i sali di ammonio (non tossici) si trasformano in ammoniaca in relazione al pH presente nel modulo: in condizioni di acidità (pH<7) gli H⁺ in eccesso andranno a legarsi all'ammoniaca formando lo ione ammonio (NH₄⁺), se invece il pH è alcalino (>7) avremo

una preponderanza di ioni ossidrilici (OH⁻). Tali ioni legando lo ione idronio dell'ammonio trasformano quest'ultimo in ammoniaca.

La salinità indica il contenuto complessivo di sali presenti. Il sale che è maggiormente presente, è il cloruro di sodio, il quale costituisce il 78% della salinità totale, seguono i cloruri di magnesio, di calcio e di potassio, i solfati e i bromuri. Vi sono anche piccolissime quantità di zinco, ferro, cromo, nichel, argento e azoto. La salinità viene espressa in parti per mille ed è stata misurata mediante rifrattometro (Salt Refractometer Modello 106 ATC prodotto dalla SPER Scientific).

La concentrazione di ossigeno disciolto influenza direttamente le capacità autodepurative dell'acqua e basse concentrazioni possono indurre processi anaerobici mettendo a rischio la sopravvivenza della maggior parte delle specie microbiche e non (Galasso, 1982; Meybeck *et al.*, 1996). L'ossigeno disciolto è stato misurato in continuo come mg di O₂/l con un ossimetro OXYCON prodotto dalla CONNET.

2.3.2 Microchem Nutrients MP4

Il Microchem Nutrients MP4 (figura 8) è un analizzatore chimico automatico basato su una nuova tecnologia analitica, sviluppata dalla SYSTEVA s.r.l, denominata Loop Flow Analysis (LFA – Analisi a Flusso Ciclico -) che consente di monitorare, in maniera sequenziale e ciclica, i seguenti parametri:

- ammoniaca
- fosfato (come ione ortofosfato)
- nitriti
- nitrati



Figura 8. Microchem Nutrients MP4

Principio di funzionamento

Il Microchem Nutrients MP4 utilizza, come metodo di indagine, la tecnica spettrofotometrica che sfrutta la capacità tipica di alcuni composti, di assorbire la luce, una volta colorati con reattivi appropriati, ad una lunghezza d'onda specifica per quella sostanza. Tale assorbimento si traduce, in base alla legge di Lambert e Beer (Lehninger, 1999), in un valore di concentrazione espressa in ppm (parti per milione o milligrammi/litro). Esso è costituito da due colorimetri uno dei quali legge alle lunghezze d'onda di 630 e 880 nanometri, che corrispondono rispettivamente alle lunghezze d'onda a cui assorbono l'ammoniaca ed il fosfato, mentre il secondo colorimetro legge a 550 nanometri che corrisponde alla lunghezza d'onda di assorbimento del nitrito.

Determinazione dell'ammoniaca

L'analisi dell'ammoniaca è basata sulla reazione di Berthelot nella quale si forma un complesso verde smeraldo ottenuto dalla reazione tra ammoniaca, fenolo alcalino, ipoclorito (sorgente di cloro) e nitroprussiato (come catalizzatore in ambiente alcalino).

Il complesso è stato letto a 630 nanometri.

Determinazione del fosfato

Per la determinazione del fosfato è stata sfruttata la reazione nella quale lo ione ortofosfato reagisce in ambiente acido con il molibdato per formare il fosfomolibdato; quest'ultimo viene ridotto a blu di molibdeno con acido ascorbico. Nella reazione viene utilizzato anche l'antimonio che ha lo scopo di aumentare la sensibilità della lettura consentendo di apprezzare anche piccole concentrazioni dello ione in questione.

Il complesso è stato letto a 880 nanometri.

Determinazione dei nitriti

Per la determinazione dei nitriti si è utilizzato il metodo nel quale i nitriti presenti nel campione reagiscono con solfanilamide e naftiletildiamina, in ambiente acido, dando origine ad un complesso colorato che varia dal rosa chiaro al fucsia a seconda della concentrazione crescente del nitrito presente nel campione.

Il complesso è stato letto a 550 nanometri.

Determinazione dei nitrati

Per la determinazione dei nitrati è stata utilizzata la stessa metodica discussa per i nitriti; questo perché, in realtà, il nitrato non viene letto come tale ma come nitrito dopo essere stato previamente ridotto facendo passare il campione attraverso una colonna di plexiglass contenente cadmio rameizzato (figura 9). I nitriti presenti nel campione, più quelli originatisi dalla riduzione, reagiscono anch'essi con la solfanilamide e la naftiletilendiamina, in ambiente acido, formando il complesso colorato che viene letto a 550 nanometri. Lo stato iniziale della colonna è stato ripristinato dopo ogni determinazione facendo fluire attraverso di essa una soluzione tampone a pH 8 contenente imidazolo.

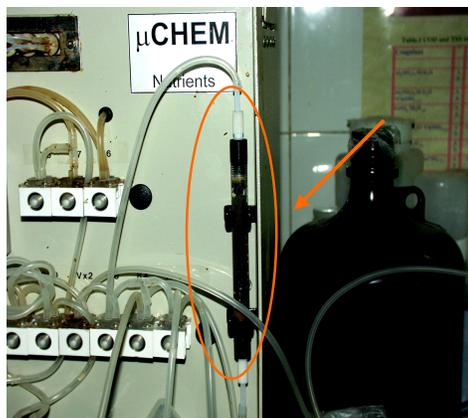


Figura 9. Colonna di plexiglass contenente cadmio rameizzato

Caricamento del campione e determinazione dei parametri

Il campione viene trasportato, tramite una pompa peristaltica, in una cella denominata Cella di Reazione (RC) (figura 10) dove avviene la reazione colorimetrica. La quantità di reattivo aggiunto alla soluzione è di circa 100 µl. In base alla retta di taratura interna, lo strumento ha determinato per interpolazione o estrapolazione, la concentrazione di ogni singolo parametro. Al termine della lettura del campione la cella è stata lavata per effettuare la determinazione successiva.

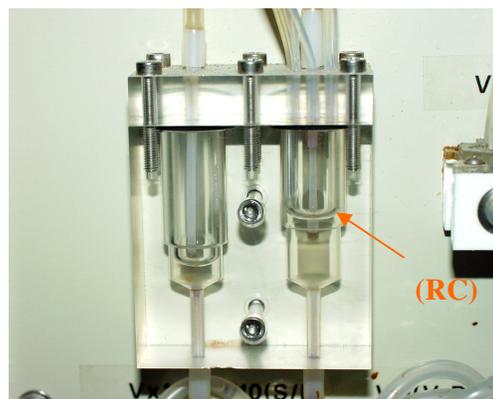


Figura 10. RC: Cella di reazione

Calcoli

Ammoniaca, fosfato, nitriti

Il valore relativo all'ammoniaca viene espresso dallo strumento come concentrazione dell'atomo di azoto presente nell'ammoniaca (N-NH₃). Per ricavare la concentrazione dell'ammoniaca, partendo dalla concentrazione dell'azoto ammoniacale, è stata utilizzata la seguente formula:

$$[\text{NH}_3]_{\text{ppm}} = \text{Valore} \times 1,21 / 1000$$

(1)

dove 1,21 è il fattore di conversione per l'ammoniaca. Si è diviso il risultato per 1000 per ottenere il valore espresso in ppm in luogo dei ppb (microgrammi/litro).

La stessa formula è stata utilizzata per la determinazione degli altri parametri, per cui vale lo stesso discorso fatto per l'ammoniaca; l'unico parametro da cambiare è stato il fattore di conversione (tabella III):

$$[\text{PO}_4^{3-}]_{\text{ppm}} = \text{Valore} \times 3.066 / 1000$$

(2)

$$[\text{NO}_2^-]_{\text{ppm}} = \text{Valore} \times 3.28 / 1000$$

(3)

Quindi la (1), (2) e (3) si possono schematizzare come segue:

$$[\text{P}]_{\text{ppm}} = \text{Valore} \times \text{FC} / 1000$$

(4)

dove:

P = Parametro da analizzare

FC = Fattore di conversione

Tabella III. Fattori di conversione

Ammoniaca: FC = 1,21
Fosfato: FC = 3.066
Nitrito: FC = 3.28
Nitrato: FC = 4.43

Nitrati

Per quanto riguarda i nitrati, la (4) è stata riarrangiata come segue:

$$[\text{NO}_3^-]_{\text{ppm}} = (\text{Valore} - [\text{NO}_2^-]) \times 4.43 / 1000$$

(5)

Questo perché, come già menzionato in precedenza, i nitrati non sono stati letti come tali ma come nitriti; quindi, per ottenere la reale concentrazione dei nitrati, sono stati sottratti al valore finale i nitriti già presenti nel campione.

Sensibilità dello strumento

La sensibilità dello strumento per i singoli parametri chimici valutati è:

$$\text{NH}_3 = 3 - 1000 \text{ ppb N}$$

$$\text{PO}_4^{3-} = 1.5 - 500 \text{ ppb P}$$

$$\text{NO}_2^- = 0.8 - 500 \text{ ppb N}$$

$$\text{NO}_3^- = 3 - 1000 \text{ ppb N}$$

Ogni volta che la concentrazione dei suddetti parametri ha superato il valore massimo rilevabile dallo strumento si è provveduto ad effettuare una diluizione del campione e poi si è moltiplicato il risultato per il fattore di diluizione stesso.

2.4 Microalghe

Nell'impianto a circuito chiuso del CRIAcq sono state coltivate sia per il sostentamento dei rotiferi e dei mitili che per le prove di coltura le microalghe *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*

Isochrysis galbana

Isochrysis galbana (figura 11) è una piccola microalga nuda di lunghezza 6 µm e larghezza 4,7 µm (diametro di 3-6 micron), provvista di flagelli e quindi mobile.

Essa appartiene alla divisione *Haptophyta*, classe *Prymnesiophyceae*, genere *Isochrysis*.

Possiedono cromatofori di colore giallo-brunasto contenenti clorofilla a e c, β-carotene e xantofille; le riserve sono costituite da oli e da crisolaminarina.



Figura 11. *Isochrysis galbana*

Tetraselmis suecica

Tetraselmis suecica (figura 12) è un'alga di dimensioni di 10-15 micron, caratterizzata da quattro flagelli e corpo ricoperto da teca costituita da strutture simili a scaglie. Appartiene alla divisione *Chlorophyta*, classe *Prasinophyceae*, ordine *Volvocales*, genere *Platymonas*.

Sono caratterizzate da un colore verde e hanno un unico cloroplasto contenente clorofilla a e b e carotenoidi; le riserve sono costituite da amido.



Figura 12. *Tetraselmis suecica*

2.4.1 Preparazione terreno di coltura algale

I sistemi di coltura algale intensivi sono rigorosamente controllati ed altamente produttivi al fine di fornire alimento allo zooplancton ed ai mitili. I terreni di coltura algale si ottengono fertilizzando l'acqua di mare con nutrienti (azoto e fosforo) necessari al fitoplancton.

Per ottenere fioriture monospecifiche è stato necessario filtrare l'acqua di mare, prelevata in siti non inquinati, mediante filtri millipore con pori dal diametro di 0,45 µm, che hanno garantito l'allontanamento di tutte le specie algali endogene al campione d'acqua stesso.

Successivamente si è proceduto all'introduzione dei nutrienti. Le quantità aggiunte per tali nutrienti variano in base al terreno di coltura algale che si è utilizzato. Nel nostro impianto sono stati utilizzati due tipi di terreno differenti: il terreno di Walne (Walne, 1974) ed il terreno f/2 di Guillard (FAO, 1999).

I due tipi di terreni differiscono per le quantità ed il rapporto N/P che presentano (*Walne*: **N** 1175,8 µmol/l, **P** 169 µmol/l; *F/2 Guillard*: **N** 878 µmol/l, **P** 36,45 µmol/l) ma per entrambi sono state registrate notevoli crescite algali.

Dopo aver filtrato l'acqua di mare sono stati aggiunti tutti i nutrienti ad eccezione delle vitamine e si è proceduto alla sterilizzazione. Per i piccoli volumi la sterilizzazione è stata effettuata in autoclave alla temperatura di 120°C ed alla pressione di 1 atm per 21 minuti, mentre per i grandi volumi è stata effettuata una sterilizzazione chimica introducendo nel terreno una quantità di ipoclorito tale da avere una concentrazione nel mezzo di 10 ppm

come Cl⁻. La sterilizzazione chimica è durata circa 24 ore; successivamente è stato necessario neutralizzare il mezzo con tiosolfato.

Dopo la sterilizzazione sono state aggiunte le vitamine che, per la loro struttura chimica, risultano essere altamente sensibili alla temperatura (Helm, 1990). Si è proceduto con l'aggiunta dell'inoculo algale che ci ha permesso di ottenere una coltura monospecifica.

2.4.2 Ceppi puri

La base della coltura algale è rappresentata dai ceppi o dalle colture di mantenimento delle specie più importanti che nel nostro caso sono *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*. Considerato il loro valore commerciale, sono state conservate in uno speciale mezzo di coltura e mantenute in condizioni di luce e temperatura accuratamente controllate. Le colture di mantenimento sono state utilizzate soltanto per fornire linee di colture iniziali. E' necessario porre la massima attenzione al fine di ridurre al minimo il rischio di contaminazione degli stock e delle colture starter da parte di organismi competitivi. Per garantire l'assenza di contaminazione sono state attuate procedure di sterilità. Le colture di mantenimento sono state conservate in 250 ml del mezzo di coltura all'interno di beute autoclavate a fondo piatto da 500 ml in vetro, tappate con cotone idrofilo sterile. Non è stata effettuata ventilazione né introduzione di anidride carbonica (Helm, 1990).

2.4.3 Colture iniziali

Le colture iniziali sono state effettuate per fornire gli inoculi necessari per avviare volumi maggiori a scopo alimentare. Si è iniziato costituendo una linea di coltura della specie richiesta, a partire dai ceppi puri.

Come in quest'ultima, le colture iniziali sono state sviluppate in beute autoclavate da 500 ml contenenti 250 ml del mezzo di coltura. Poichè sono richieste per la fornitura di inoculi, è stato necessario farle accrescere mantenendole ad una temperatura di 20-22°C ed ad una distanza di 15-20 cm da un'unica lampada da 65-80 W, che produce un livello di illuminazione di 4.750- 5.250 lux.

Quando la coltura iniziale era matura per essere utilizzata, è stata effettuata una sottocoltura con metodi sterili: 20 ml sono stati trasferiti in un nuovo mezzo di accrescimento mentre il resto è stato utilizzato come inoculo per colture più grandi destinate a fungere da alimento per altri organismi.

Talvolta sono necessari grandi volumi di colture iniziali per inoculare grandi colture produttive. Per avere 2 l di coltura iniziale, utile per inoculare circa 200 l di coltura produttiva, abbiamo utilizzato un volume di 250 ml. Quando la coltura è servita a fini di inoculo, sono stati impiegati circa 200 ml per avviare un nuovo mezzo di accrescimento da 2 l ed il resto è stato utilizzato per avviare la produzione di 120 l (figura 13). Con volumi maggiori è opportuno aumentare il livello di illuminazione ed aerare la coltura (Helm, 1990).

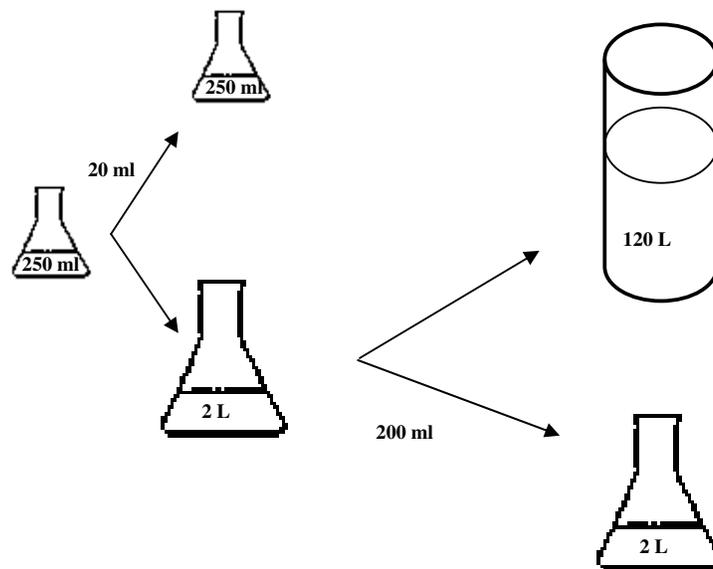


Fig. 13. Schema di produzione algale per inoculi successivi

2.4.4 Test di crescita algale

Scopo

Per verificare la possibilità di recupero dei reflui d'acquacoltura mediante il sistema di depurazione a biodischi si è proceduto effettuando prove di crescita algale nell'effluente depurato. Le specie algali utilizzate per il test sono state *Tetraselmis suecica* ed *Isochrysis galbana*.

Preparazione del campione

Il refluo biotrasformato nel modulo di depurazione a biodischi rotanti veniva prelevato con cadenza mensile ed utilizzato per effettuare prove di crescita algale. Mediante delle bottiglie in vetro borosilicato sono stati prelevati circa 2 litri di campione. Il campione veniva filtrato a 0,45 μm e sterilizzato in autoclave. Dopo raffreddamento si è proceduto

con l'aggiunta delle vitamine e si è suddiviso il campione in sei beute da 300 ml ciascuna in quanto il test veniva replicato 3 volte e a ciascuna veniva aggiunto inoculo algale.

Inoltre data la composizione altamente variabile della soluzione in uscita dal depuratore, nei mesi di Dicembre e Febbraio si è proceduto con l'effettuare dei test aggiuntivi per valutare l'elemento nutritivo limitante la crescita algale.

Gli elementi nutritivi aggiunti sempre a 300 ml di refluo biotrasformato sono stati: FeCl₃, NaNO₃ e tutti i nutrienti presenti nel terreno di Walne. Ogni test è stato condotto in triplicato e le quantità di nutrienti aggiunti in 300 ml di refluo biotrasformato sono state quelle riportate nel terreno di Walne..

Il controllo in questo test è stato rappresentato dal terreno standard di Walne e di Guillard.

Inoculo algale

Il saggio algale prevede di aggiungere nelle beute una quantità standardizzata di sospensione algale a concentrazione nota e costante (inoculo).

L'inoculo veniva preparato a partire da una coltura di mantenimento in fase esponenziale di crescita, centrifugata per 5 minuti a 2000 rpm e sospesa nella soluzione di lavaggio rappresentata da acqua marina filtrata a 0,45 µm ed autoclavata. Dopo 24 ore di incubazione veniva determinata la concentrazione algale dell'inoculo al fine di aggiungere nel campione una aliquota tale da ottenere una concentrazione algale finale di 1000 o 10.000 cell/ml (Sbrilli *et al.*, 1998; Sbrilli, 2000).

Le beute venivano chiuse mediante ovatta idrofoba sterile e sottoposte ad illuminazione continua con intensità luminosa superiore ai 4500 lux ed a una temperatura di 21 ± 1 °C. Con cadenza giornaliera veniva determinata la concentrazione algale mediante camera di Bürker.

2.5 Valore nutrizionale delle microalghe accresciute nel refluo depurato

Il valore nutrizionale delle microalghe accresciute nel refluo depurato (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*) è stato valutato mediante il loro contenuto in proteine (Metodo di Kjeldahl - G.U., 1994), carboidrati e acidi grassi polinsaturi.

La preparazione del campione per le diverse analisi è stata effettuata utilizzando le colture algali (accresciute sia nel refluo biotrasformato che nel terreno di Walne) nella fase esponenziale finale di crescita (Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999) anche se in altri studi (Brown e Miller, 1992; Brown e Farmer, 1994) i campioni analizzati erano in fase

stazionaria. I campioni sono stati prelevati con cadenza settimanale per entrambe le specie per un periodo di circa 4 mesi.

Le colture algali sono state centrifugate (4000 rpm per 15 min); il surnatante veniva versato e il pellet raccolto veniva conservato a -20°C e liofilizzato (Brown *et al.*, 1997).

Metodi analitici, sensibili e specifici, sono richiesti per valutare la concentrazione dei nutrienti in piccole quantità di campioni di microalghe disponibili.

2.5.1 Carboidrati

Il metodo utilizzato per valutare i carboidrati è il *Metodo enzimatico-gravimetrico* (Prosky *et al.*, 1985), che risulta applicabile a tutti gli alimenti compresi i prodotti destinati ad una alimentazione particolare e alle microalghe.

Principio e procedimento del metodo

Il metodo prevede una digestione enzimatica del campione mediante alfa-amilasi - stabile al calore-(unicamente per *I. galbana*), proteasi ed aminoglucosidasi (al fine di rimuovere le proteine) e una successiva precipitazione con etanolo. Il residuo è poi filtrato ed essiccato. La massa ottenuta, detratte le ceneri e le rimanenti proteine, costituisce il contenuto in carboidrati totale. E' possibile schematizzare il procedimento utilizzato come segue:

a. **Digestione enzimatica** – Introdurre il campione – circa 1 g - in un becker da 600 ml, unitamente a 50 ml di tampone fosfato (0,08 M, pH 6,0) ed a 100 µl di alfa-amilasi (stabile al calore - da *Bacillus licheniformis*, avente una attività approssimativa di 1.500 unità/ml), miscelando accuratamente. Introdurre i becker, coperti con un foglio di alluminio, in un bagnomaria bollente per 35 minuti dopo il raggiungimento nella sospensione di una temperatura pari a 95-100°C agitando delicatamente ogni 5 minuti.

Raffreddare a temperatura ambiente e portare a pH $7,5 \pm 0,2$ con una soluzione di idrossido di sodio 0,275 N; aggiungere 0,1 ml della soluzione di proteasi (da *Bacillus licheniformis*, avente una attività approssimativa di 10 unità/mg di solido), miscelare accuratamente ed incubare per 30 minuti in bagnomaria con agitazione continua.

Raffreddare fino a temperatura ambiente e portare il pH a 4,0 – 4,6 con una soluzione di acido cloridrico 0,325 N; aggiungere 300 µl di aminoglucosidasi (da *Aspergillus niger*, avente un'attività approssimativa di 3000 unità/ml), miscelare accuratamente, coprire il becker con un foglio di alluminio ed incubare per 30 minuti in bagnomaria a 60°C con agitazione continua.

b. **Precipitazione e filtrazione** – Preparare i crogioli come segue: porre in ciascun crogiolo 0,5 g di celite (Celite 545 trattata con HCl, lavata ed essiccata, o farina analoga simile), condizionare in muffola alla temperatura di 550°C per 1 h, raffreddare in essiccatore e pesare con una accuratezza di 0,1 mg. Prima di eseguire la filtrazione del campione ridistribuire la celite nel crogiolo usando alcuni millilitri di etanolo al 78% e mediante aspirazione formare un letto di filtrazione che permetta poi una facile rimozione del materiale.

Aggiungere 280 ml di etanolo al 95% preriscaldato a 60°C misurando il volume dopo riscaldamento e lasciar precipitare per un'ora a temperatura ambiente.

Filtrare attraverso il crogiolo in beuta da vuoto. Lavare il residuo tre volte con 20 ml di etanolo al 78%, 2 volte con 10 ml di etanolo al 95% e 2 volte con 10 ml di acetone.

Essiccare i crogioli per una notte a 70°C nella stufa sotto vuoto oppure a 105°C in quella ad aria fino a peso costante.

Raffreddare in essiccatore e pesare con una accuratezza di 0,1 mg; sottrarre la tara del crogiolo con la celite e registrare la massa del residuo.

c. **Determinazione di proteine e ceneri** – Determinare su uno dei residui le proteine con il metodo di Kjeldhal, utilizzando il fattore specifico per la conversione dell'azoto in proteine. Incenerire il secondo residuo in muffola per 5 h a 550°C; raffreddare in essiccatore e pesare con una accuratezza di 0,1 mg. Sottrarre la tara del crogiolo con la celite per determinare le ceneri.

Espressione dei risultati

Allo scopo di facilitare l'espressione dei risultati, vengono di seguito riportati i prospetti di calcolo per la determinazione del bianco (1) e del campione (2):

$$Bianco = \frac{R_1 + R_2}{2} - P - A \quad (1)$$

dove:

P = massa delle proteine

A = massa delle ceneri

R₁ = risultato della prima pesata dell'analisi

R₂ = risultato della seconda pesata

Il contenuto in carboidrati del campione, espresso in percentuale, è stato calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Carboidrati (g/100 g)} = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - P - AB}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \times 100 \quad (2)$$

dove:

m₁ = prima pesata del campione su cui eseguire l'analisi

m₂ = seconda pesata del campione su cui eseguire l'analisi

B = bianco

2.5.2 Determinazione del contenuto in acidi grassi polinsaturi

Essendo le microalghe il primo alimento di larve, giovanili di bivalvi e di larve di alcuni crostacei e di alcuni pesci, il loro contenuto in acidi grassi polinsaturi è importante per garantire il corretto sviluppo degli organismi sopra riportanti.

Principio e procedimento del metodo

Il metodo (Whyte, 1987; Brown *et al.*, 1997) prevede l'estrazione dei lipidi totali dal campione e gli acidi grassi presenti nei lipidi totali estratti sono transesterificati a metil esteri ed analizzati mediante Gas Cromatografo usando colonne capillari polari e non polari.

E' possibile schematizzare il procedimento come segue:

a. **Estrazione dei lipidi totali** - Pesati 500 mg di alghe liofilizzate (2 prove per ogni campione) aggiungere 25 ml di una soluzione cloroformio – metanolo – acqua (2:4:1) e omogeneizzare per 30 secondi. Centrifugare per 1 min a 3000 rpm e raccogliere il sovranatante in un imbuto separatore da 500 ml facendolo passare attraverso carta da filtro per evitare eventuali precipitati. Aggiungere 25 ml della soluzione precedente e ripetere tale operazione fino ad arrivare ad un massimo di 350 ml di soluzione aggiunta. Dopo ogni aggiunta omogeneizzare il campione per un minuto e centrifugarlo a 3000 rpm per 1 min. Ogni sovrinatante va aggiunto al precedente nell'imbuto separatore.

Aggiungere 100 ml di una soluzione cloroformio-acqua (1:1) e recuperare la fase organica.

b. **Estrazione acidi grassi** - Aggiungere 50 ml di una soluzione di NaCl al 5% e riversare il tutto negli imbuti separatori. Raccogliere la fase organica facendola passare su un filtro contenente sodio solfato anidro (circa 6 cucchiaini) in palloni precedentemente pesati. Risciacquare sempre su filtro con cloroformio puro. Portare a secco mediante rotovapor e pesare i palloni con l'estratto secco.

Aggiungere 4 ml di esano ad ogni pallone e raccogliere l'estratto. Pesare nuovamente i palloni con il residuo secco per vedere quanto se ne è perso. Raccogliere il residuo rimasto con 4 ml di cloroformio. Ripesare i palloni per conoscere la quantità di campione rimasto.

c. **Lettura al Gas cromatografo** – Gli acidi grassi transesterificati a metil esteri sono analizzati mediante Gas Cromatografo usando colonne capillari polari e non polari.

2.6 Test di crescita di semi di *Mytilus galloprovincialis*

Per valutare la capacità nutrizionale delle microalghe marine *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*, coltivate nella soluzione biotrasformata, è stato effettuato un test di crescita di mitili giovanili della specie *Mytilus galloprovincialis*; contemporaneamente controlli venivano effettuati con organismi allevati off-shore (porto di Baia) e in-shore (mediante le stesse microalghe marine ottenute mediante sistemi di allevamento standard).

Il test di crescita è stato realizzato utilizzando mitili, selezionati in base alla lunghezza, prelevati da un impianto di allevamento collocato nel porto di Baia.

Sono stati valutati anche altri parametri dimensionali (larghezza, altezza, peso vivo, peso umido frutto, peso secco frutto e peso valve) (Camacho *et al.*, 1995) e da 60 individui scelti sono stati formati 4 gruppi da 15, di cui 2 sono stati rincalzati e collocati nel porto di Baia a differenti profondità (4,5 m e 10 m) e altri due sono stati disposti in 2 vaschette da 40 l nell'impianto del CRIAcq.

I due gruppi di 15 mitili disposti in contenitori in plastica da 40 l ciascuna, erano debolmente aereati, garantendo una aliquota di O₂ in soluzione non inferiore ai 6,5 ppm ed una buona miscelazione del mezzo. L'acqua di allevamento veniva sostituita con cadenza giornaliera; la salinità era mantenuta tra 35-38 ‰ e la temperatura intorno ai 18±1°C. Ciascuna prova di crescita è stata effettuata per 10 settimane.

I mitili venivano alimentati due volte al giorno mediante microalghe vive delle specie *Tetraselmis suecica* ed *Isochrysis galbana*. Tali microalghe coltivate in condizioni standard, sia utilizzando il terreno di Walne sia l'effluente biotrasformato mediante il

depuratore a biodischi, venivano raccolte alla fine della fase esponenziale di crescita. L'aliquota di alghe fornita agli organismi veniva valutata tenendo conto delle diverse dimensioni delle due specie algali e che la capacità filtrante dei mitili è massima per concentrazioni algali comprese tra 60.000 e 100.000 cell/ml.

I mitili erano alimentati con una razione piena di microalghe costituita da $100 \cdot 10^6$ cellule di *Tetraselmis suecica* e $300 \cdot 10^6$ cellule di *Isochrysis galbana* per mitile al giorno (Langdon e Önal, 1999).

Ogni 24 h dalla somministrazione dell'alimentazione, venivano contate mediante camera di Burker le alghe presenti nell'acqua d'allevamento al fine di valutare la capacità di assorbimento dei mitili. Con la stessa cadenza l'acqua veniva completamente sostituita.

La valutazione dell'accrescimento degli organismi test veniva effettuata campionando i 4 gruppi testati al tempo zero del test e successivamente ogni 20 giorni misurando i principali parametri dimensionali: lunghezza, altezza e larghezza mediante calibro con un accuratezza di 1/20 mm; peso vivo, peso umido del frutto sgocciolato e peso delle valve mediante bilancia analitica con un accuratezza di $\pm 0,1$ mg.

Campioni di 3 individui selezionati come rappresentativi di ogni gruppo test per la loro lunghezza venivano utilizzati per valutare il peso secco.

Con questo scopo il muscolo adduttore veniva tagliato e l'acqua intervalvare era allontanata ponendo i frutti su carta assorbente. Il frutto e le valve erano poi seccate in stufa a 80°C fino al raggiungimento di un peso costante e successivamente pesate su bilancia analitica (Navarro *et al.*, 1996).

Attraverso il loro peso secco è stato valutato il tasso di crescita specifico (TCS%) e l'aumento di lunghezza delle valve (Shpigel *et al.* 1996).

$$\text{TCS\%} = [(\ln W_2 - \ln W_1) / t_2 - t_1] * 100;$$

dove W_2 è il peso secco finale, W_1 il peso secco iniziale, $t_2 - t_1$ è il tempo, espresso in giorni, intercorso tra le due misure.

L'indice di condizione – con il quale generalmente si pone in relazione il frutto con il guscio – viene utilizzato sia per ricerche scientifiche che in campo produttivo.

Nel presente lavoro si è proceduto con il valutare l'Indice di Condizione, espresso come rapporto tra il peso secco del frutto (DW) e il peso secco delle valve (VW), in accordo all'equazione (Freeman, 1974):

$$\text{CI} = (\text{DW}/\text{VW}) * 100$$

Capitolo 3
Risultati e Discussioni

3.1 Parametri chimico-fisici

I grafici 1 e 2 descrivono l'andamento delle medie mensili ed i range di variabilità dei principali parametri chimico-fisici misurati nell'impianto di depurazione a biodischi durante il periodo di monitoraggio.

Dall'analisi dei dati si rileva che la temperatura (grafico 1A) permane nel corso dell'anno su valori pressochè costanti, presentando un valore medio annuale di circa $20,12 \pm 2,63$ °C. Il modulo è privo di un termoregolatore ed il mantenimento della temperatura è stato attuato mediante l'utilizzo di un climatizzatore per l'ambiente, che mantiene costante la temperatura dell'intero impianto sui 20 ± 1 °C; nei mesi però da gennaio a maggio 2005 la temperatura nell'impianto è stata portata a 15°C, per la presenza nel modulo di stabulazione dell'impianto di riproduttori di *Scophtalmus maximus*. L'intervallo utile allo sviluppo della flora nitrificante è compreso entro 4-45°C, benchè la temperatura ottimale sia compresa nell'intervallo 25-35°C (Fantei *et al.*, 1992; Saroglia, 2001).

E' importantissimo però ricordare che più del valore in sé, è fondamentale non avere brusche variazioni (Fantei *et al.*, 1992) e che altri studi effettuati hanno utilizzato lo stesso range di temperatura, qui riportato, con ottimi risultati (Jerome *et al.*, 1998; Skjølstrup *et al.*, 1998).

L'andamento del pH osservato (grafico 1B) mostra nella fase di avvio del biofiltro un contenuto abbassamento dovuto al consumo di carbonati compiuto dai batteri. Anche se tali batteri possono operare in un range di pH molto ampio (6-9) si cerca di mantenere il pH in un campo compreso fra 6,5 e 8 in modo da ottenere velocità di reazioni enzimatiche accettabili (Fantei *et al.*, 1992; Saroglia, 2001). Notevoli variazioni di pH in realtà non si riscontrano nei sistemi di depurazione di reflui marini dove l'elevata capacità tamponante dell'acqua di mare non ne induce un eccessivo abbassamento; infatti dopo i primi tre mesi, il valore del pH si è stabilizzato su un valore medio di $7,69 \pm 0,16$, perfettamente idoneo all'attività batterica.

Dai dati relativi all'ossigeno disciolto (misurato in mg/l) (grafico 2.A) si evince chiaramente che vi è un decremento iniziale (da Febbraio a Giugno) del valore ($6,9 \rightarrow 0,8$ ppm) dovuto ad un aumento della velocità di crescita della popolazione batterica fino ad arrivare ad un valore medio pressoché costante ($1,9 \pm 1,3$ da Luglio 2004 a Maggio 2005) anche se altamente variabile durante l'arco di un mese. Tale variabilità potrebbe essere dovuta al mutevole contenuto nutritivo del refluo che causerebbe variazioni nelle

dinamiche di popolazioni batteriche; infatti, il tempo medio di generazione dei batteri nitrificanti è strettamente legato alla concentrazione di substrato presente nel sistema. Per i batteri nitrificanti è fondamentale assicurare livelli di ossigeno disciolto superiori ad 1,5 ppm per garantire la loro attività metabolica (Fantei *et al.*, 1992); per cui, per mantenere tale concentrazione di O₂ e assicurare una perfetta ossigenazione del letto filtrante, è stato necessario dislocare nel modulo diversi punti di aerazione (due aereatori sono stati disposti nella vaschetta di ingresso e altri due prima del trattamento biologico operato dai biodischi).

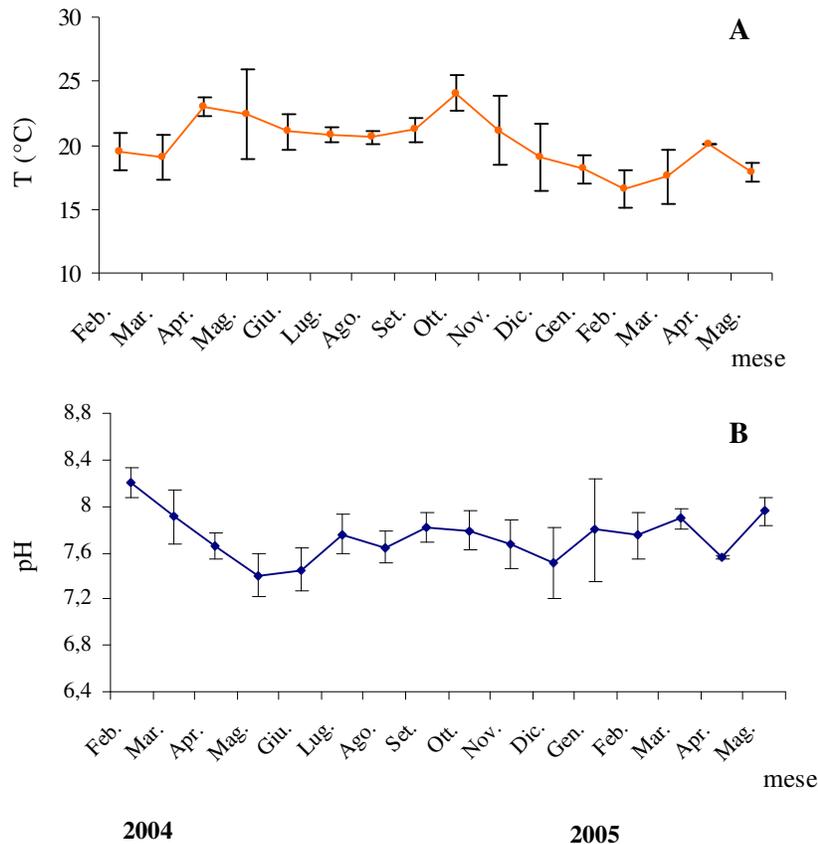


Grafico 1. A: Andamento medio mensile e range di variabilità della temperatura (°C) valutata all'ingresso del modulo di depurazione. **B:** Andamento medio mensile e range di variabilità del pH valutato all'ingresso del modulo di depurazione.

La salinità è stata mantenuta - mediante l'aggiunta di acqua dolce lasciata decantare per 24 ore per eliminare possibili residui di cloro attivo - su un valore medio annuo di $37,14 \pm 1,69 \text{ ‰}$ (grafico 2. B), in quanto il refluo in uscita è stato utilizzato come terreno di coltura

algale – le alghe oggetto di ricerca richiedono una salinità di circa il 36‰ – e le performance dei batteri nitrificanti non risultano ridotte da variazioni di salinità.

Tali batteri infatti sono in grado di sopportare variazioni in concentrazione salina fino a ± 5 g/l (Saroglia, 2001).

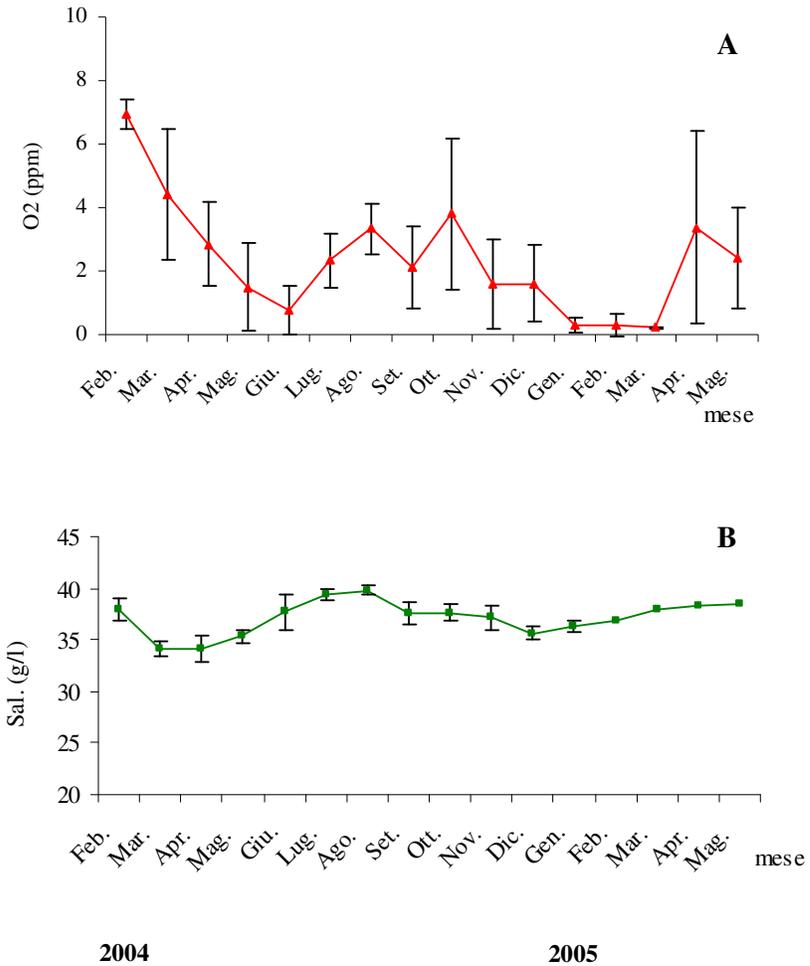


Grafico 2. A: Andamento medio mensile e range di variabilità dell’ossigeno disciolto (ppm) valutato all’ingresso del modulo di depurazione. **B:** Andamento medio mensile e range di variabilità della salinità (g/l o ‰) valutata all’ingresso del modulo di depurazione.

3.2 Anidride carbonica, alcalinità e BOD5

Alcalinità

L'alcalinità è stata valutata con cadenza settimanale sul refluo in ingresso al modulo di depurazione a biodischi e sul refluo biotrasformato ottenuto dopo un tempo di ritenzione di circa 20 h. I valori di alcalinità misurati sono da imputare alla presenza di bicarbonati, che nell'acqua di mare sono presenti sotto forma di bicarbonati di calcio e magnesio e sono responsabili della elevata capacità tampone di quest'ultima.

Il pH e l'alcalinità sono probabilmente i fattori che più influenzano le performance dei batteri nitrificanti e sono strettamente correlati tra di loro (Saroglia, 2001). Dai dati ottenuti è evidente che i valori di alcalinità nel refluo biotrasformato (Al out) sono sempre inferiori a quelli valutati sul refluo in ingresso (Al in). Infatti per sostenere il metabolismo batterico non è sufficiente la presenza di ossigeno, azoto ed idrogeno, ma altri elementi entrano nella reazione e vengono consumati. Le reazioni che si verificano infatti includono un consumo di carbonio, la cui risorsa è costituita da carbonati e bicarbonati sciolti in acqua (Saroglia, 2001).

Quindi l'ossidazione dell'azoto ammoniacale determina, oltre al consumo di ossigeno, una riduzione dall'alcalinità. L'andamento medio mensile ed i range di variabilità dell'alcalinità durante l'anno di monitoraggio (grafico 3), mostra un iniziale incremento del valore da Marzo a Giugno ($262 \pm 11,31 \rightarrow 468 \pm 82,58$) ed un decremento da Luglio ad Ottobre per poi risalire, sempre in modo lineare, da Novembre a Gennaio e diminuire da Febbraio 2005 in poi. Il valore medio annuo dell'alcalinità del refluo in ingresso al depuratore è stato di $304,03 \pm 83,98$ ppm, mentre in uscita nel refluo biotrasformato pari a $257,77 \pm 69,07$ ppm. L'andamento registrato sembrerebbe ripercorrere le fasi di sviluppo della flora nitrificante sui biodischi ed il tipo di refluo introdotto. L'accumulo iniziale di alcalinità, dovuto alle aggiunte giornaliere di refluo proveniente da altri impianti d'acquacoltura, diminuisce nei mesi di Agosto, Settembre ed Ottobre non solo per l'accrescersi della flora batterica ma soprattutto per l'introduzione in questi mesi di cloruro di ammonio e nitrito di sodio e non di un refluo organico di acqua marina. Lo stesso andamento sembra però ripresentarsi da Ottobre ad Aprile facendo presupporre anche delle dinamiche di popolazione dovute all'alta variabilità del contenuto del refluo.

Se si osserva l'andamento della percentuale di abbattimento mensile dell'alcalinità (grafico 4) si osserva come il valore maggiore sia stato registrato nel mese di Dicembre (30,05%) e

che comunque il valore medio annuo della percentuale d'abbattimento è di $14,60\% \pm 10,78$.

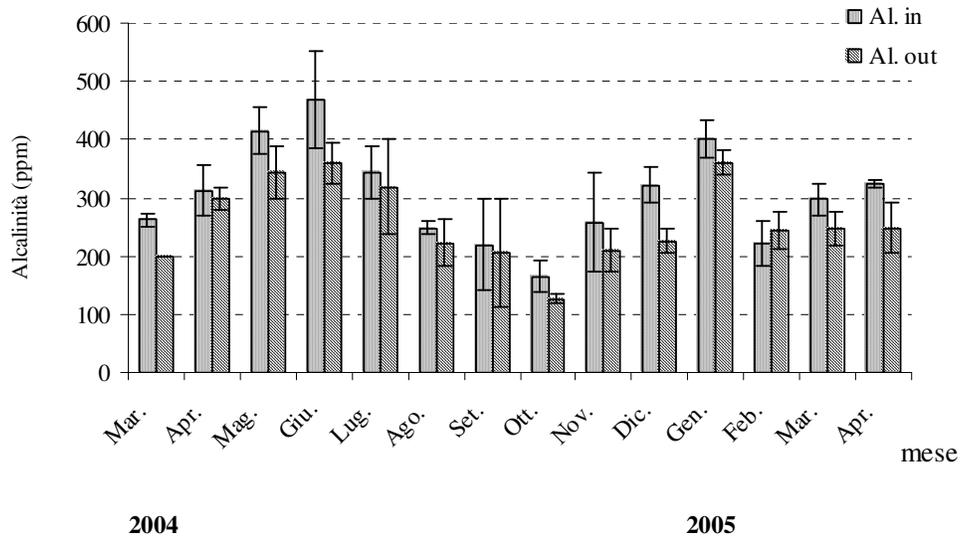
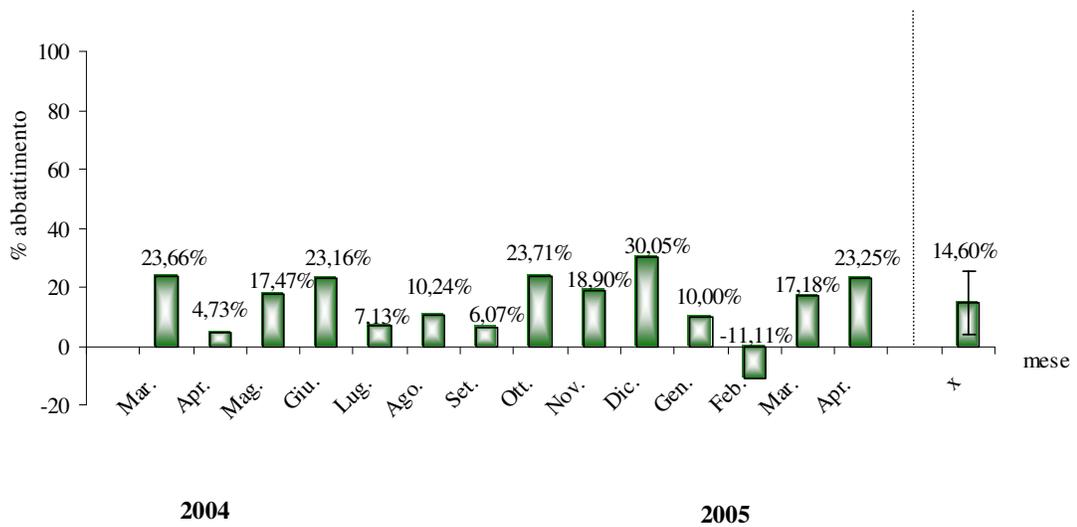


Grafico 3. Andamento medio mensile e range di variabilità dell'alcalinità (ppm) valutata in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biodischi durante l'anno di monitoraggio



Graf. 4. Andamento della percentuale d'abbattimento mensile dell'alcalinità registrata durante l'anno di monitoraggio e media annuale ($x \pm \sigma$)

Anidride carbonica

Al fine di valutare il grado di ossigenazione del sistema ed il livello di sviluppo della biomassa filtrante è stata valutata con cadenza settimanale l'anidride carbonica sia sul refluo in ingresso al modulo di depurazione a biodischi che sul refluo biotrasformato ottenuto dopo un periodo di ritenzione di circa 20 ore. La concentrazione dell'anidride carbonica (grafico 5) non mostra grandi differenze in ingresso (CO₂ in) ed in uscita (CO₂ out) al sistema, presentando infatti un valore medio da Marzo 2004 a Gennaio 2005 in ingresso di $227,3 \pm 36,44$ ppm ed in uscita di $223,41 \pm 67,50$ ppm, indice del buon livello di ossigenazione del sistema. I valori più elevati di CO₂ registrati negli ultimi 2 mesi (Febbraio e Marzo 2005) corrispondono al periodo in cui si è registrata la minima concentrazione di ossigeno.

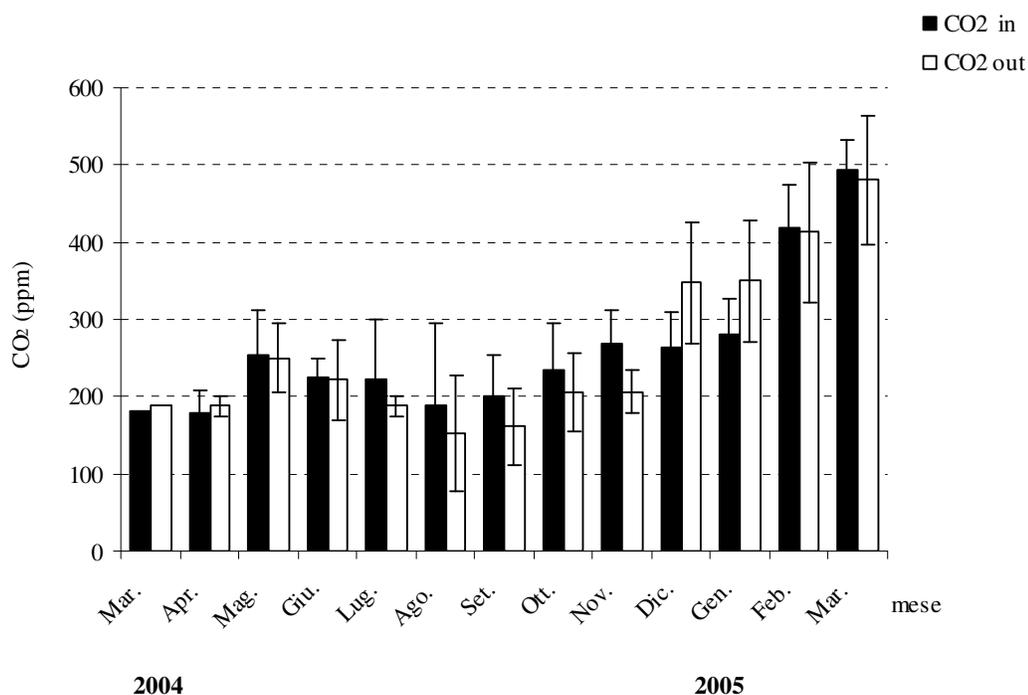


Grafico 5. Andamento medio mensile e range di variabilità dell'anidride carbonica (ppm) valutata in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biodischi durante l'anno di monitoraggio

Inoltre, è necessario ricordare che il destino dell'anidride carbonica in acqua è quello di formare acido carbonico il quale reagendo a sua volta con l'acqua, porta alla formazione di bicarbonati e idrogenioni. Poichè, come detto in precedenza, l'attività batterica nitrificante induce una riduzione dei carbonati e un accumulo di sostanze acide (H₃O⁺), è necessario adottare opportune misure (buona ossigenazione del mezzo e *stripping*) al fine di allontanare l'anidride carbonica che altrimenti tende ad accumularsi (Saroglia, 2001).

L'adozione nel nostro caso di un biofiltro non completamente e continuamente immerso, fa sì che il contatto tra aria e acqua che ne deriva è sufficiente ad allontanare l'anidride carbonica, che permane comunque su valori apprezzabili per l'attività metabolica che costantemente si attua nel modulo.

Biochemical Oxygen Demand

Per valutare il carico organico presente nel refluo e la capacità ossidativa del sistema è stato valutato con cadenza settimanale il BOD5 sia sul refluo in ingresso al modulo di depurazione a biodischi che sul refluo biotrasformato ottenuto dopo un tempo di ritenzione del refluo di circa 20 ore. I tipi principali di microrganismi interessati in questo processo sono i batteri eterotrofi e quelli nitrificanti. Dai dati medi mensili del BOD5 in ingresso (BOD5 in) ed in uscita al sistema (BOD5 out) (grafico 6) si osserva un valore nel refluo biotrasformato sempre inferiore a quello registrato in ingresso per la riduzione del carico organico effettuato dalla biomassa filtrante presente nel modulo e massimamente collocata sui biodischi.

Si è registrato durante l'anno di monitoraggio una percentuale di abbattimento del BOD5 del 91,12% (grafico 7).

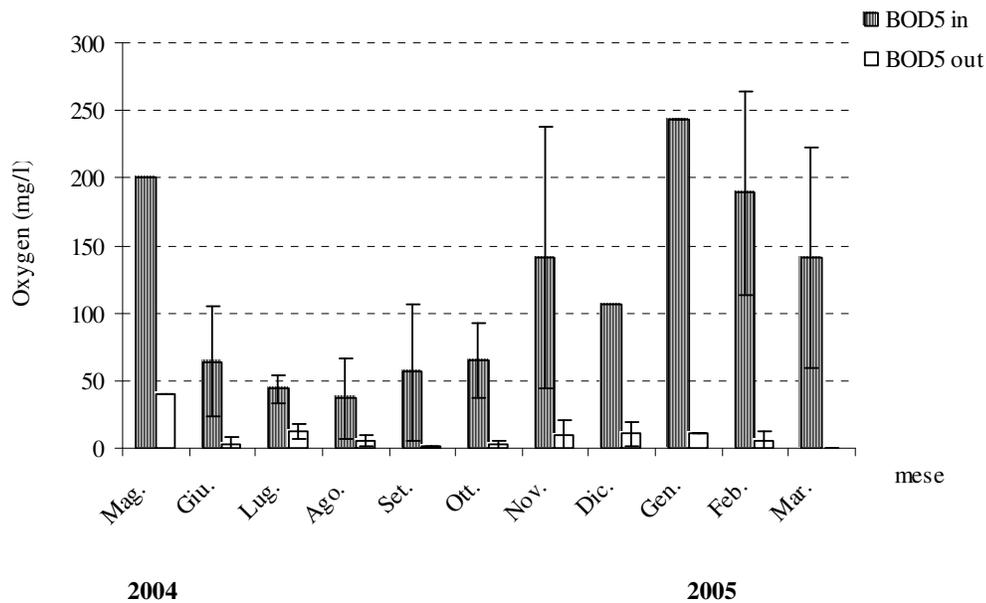


Grafico 6. Andamento medio mensile e range di variabilità del BOD5 (O_2 mg/l) valutato in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biodischi durante l'anno di monitoraggio

Tale valore sottolinea il buon funzionamento del modulo di depurazione soprattutto alla luce del fatto che i valori del BOD5 nel refluo biotrasformato sono stati sempre inferiori ai 40 ppm, che è il limite imposto dalla legge per gli scarichi convogliati nei corpi idrici recettori.

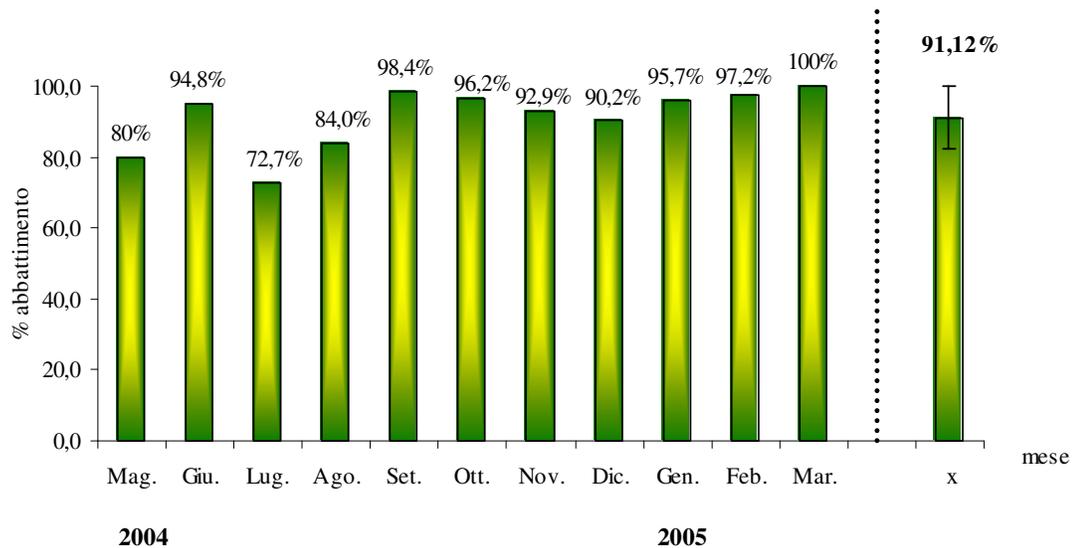


Grafico 7. Andamento della percentuale d'abbattimento mensile del BOD5 registrata durante l'anno di monitoraggio e media annuale ($x \pm \sigma$)

3.3 *Analisi dei principali nutrienti presenti nel refluo*

Per valutare l'efficienza complessiva dell'impianto di depurazione a biodischi e lo sviluppo della flora batterica nitrosante e nitricante sono state analizzate le concentrazioni dei principali nutrienti (ammoniaca, nitriti, nitrati e ioni fosfato) in ingresso e in uscita al depuratore. I risultati ottenuti hanno consentito l'utilizzo del refluo biotrasformato come terreno di coltura algale.

Ammoniaca

Dai risultati ottenuti (grafico 8 e 9) si osserva un generale abbattimento dell'ammoniaca in uscita al depuratore nel refluo biotrasformato durante l'intero anno di monitoraggio. Le concentrazioni in ingresso sono alquanto variabili sia per l'elevata mutevolezza del contenuto dei reflui, sia per la diversa provenienza dei reflui introdotti nel modulo

(paragrafo 2.2 tabella II). Nei mesi di Luglio, Agosto e Settembre si è effettuato l'avvio chimico della biomassa filtrante mediante l'utilizzo di cloruro di ammonio, causando un incremento della concentrazione dell'ammoniaca (grafico 8).

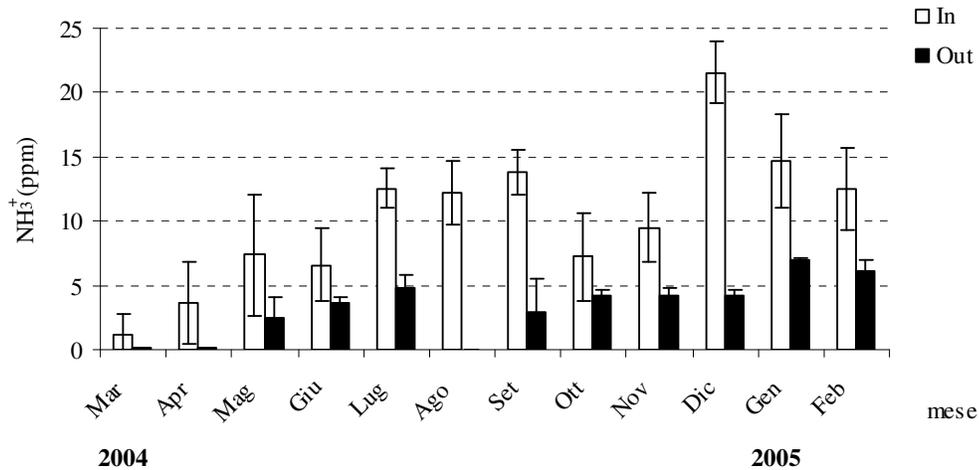


Grafico 8. Andamento medio mensile e range di variabilità dell'ammoniaca (NH₃⁺ppm) valutato in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biodischi durante l'anno di monitoraggio

L'elevata concentrazione registrata nel mese di Dicembre potrebbe essere legata al maggior utilizzo nell'impianto di mangime naturale, impiegato nel periodo riproduttivo; questo comporta un maggior contenuto di ammoniaca nel refluo introdotto nel sistema.

L'efficienza media annuale di abbattimento dell'ammoniaca è stata del 67,55%, con picchi nei mesi di Marzo, Aprile, Agosto, Settembre e Dicembre (grafico 9).

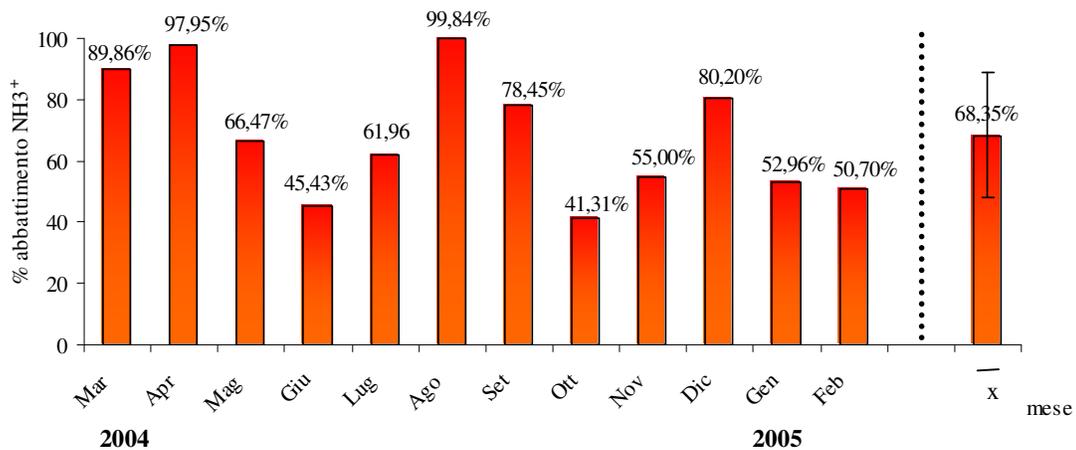


Grafico 9. Andamento della percentuale d'abbattimento mensile dell'NH₃⁺ registrata durante l'anno di monitoraggio e media annuale (x ± σ)

La bassa efficienza registrata nel mese di Ottobre è probabilmente da imputare all'utilizzo di un differente tipo di refluo - passaggio da fase di avvio chimico ($\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NaNO}_2$) a refluo organico d'acquacoltura - .

Nitriti

Dai risultati ottenuti durante il periodo di monitoraggio (grafico10 e 11) si osserva in uscita al depuratore nel refluo biotrasformato un generale abbattimento sia dei nitriti già presenti all'ingresso dell'impianto che di quelli derivanti dal processo di ossidazione dell'ammoniaca. I picchi in ingresso registrati nei mesi di Agosto e Settembre sono dovuti all'introduzione di NH_4Cl e NaNO_2 , utilizzati nella fase chimica di avvio del filtro biologico.

L'efficienza media annuale di abbattimento dei nitriti è stata del 73,84%, con valori elevati nella gran parte dei mesi ad eccezione di Aprile dove la concentrazione di nitriti è maggiore in uscita rispetto all'entrata probabilmente per il completo abbattimento dell'ammoniaca in ingresso e la scarsa formazione di nitrosanti, che generalmente si sviluppano sempre dopo i nitricanti, responsabili dell'ossidazione dell'ammoniaca a nitrito (grafico 11)(Saroglia, 2001).

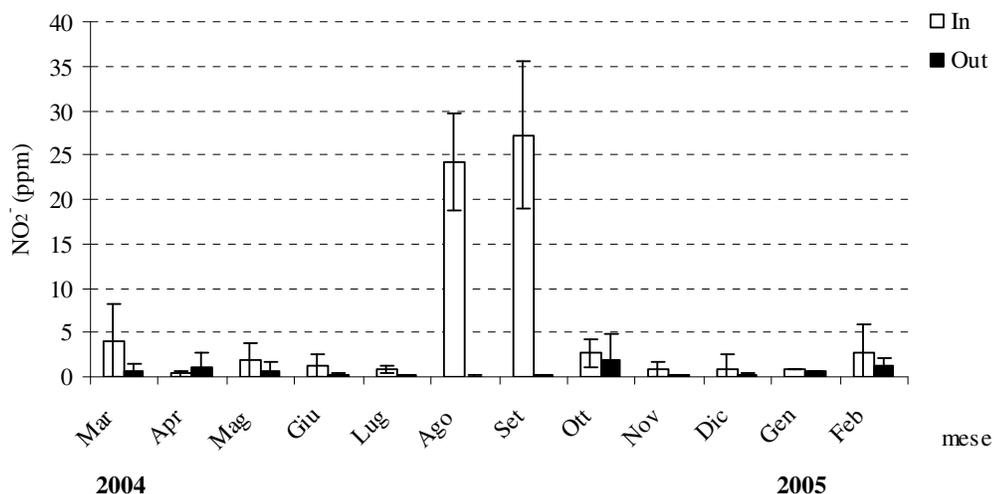


Grafico 10. Andamento medio mensile e range di variabilità del nitrito (NO_2^- ppm) valutato in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biodischi durante l'anno di monitoraggio

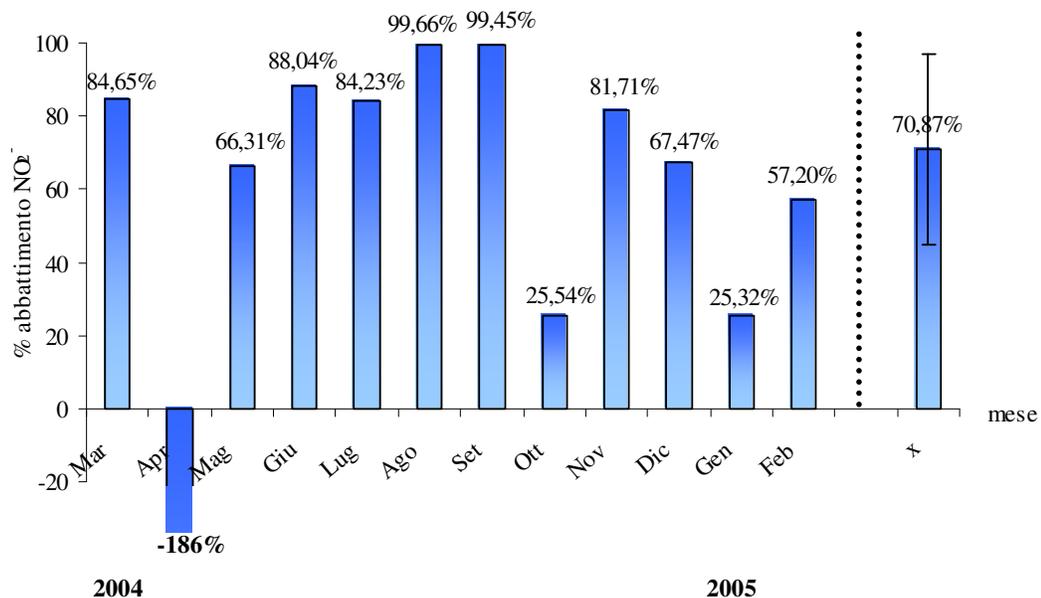


Grafico 11. Andamento della percentuale d'abbattimento mensile dell'NO₂⁻ registrata durante l'anno di monitoraggio e media annuale (x) ± σ

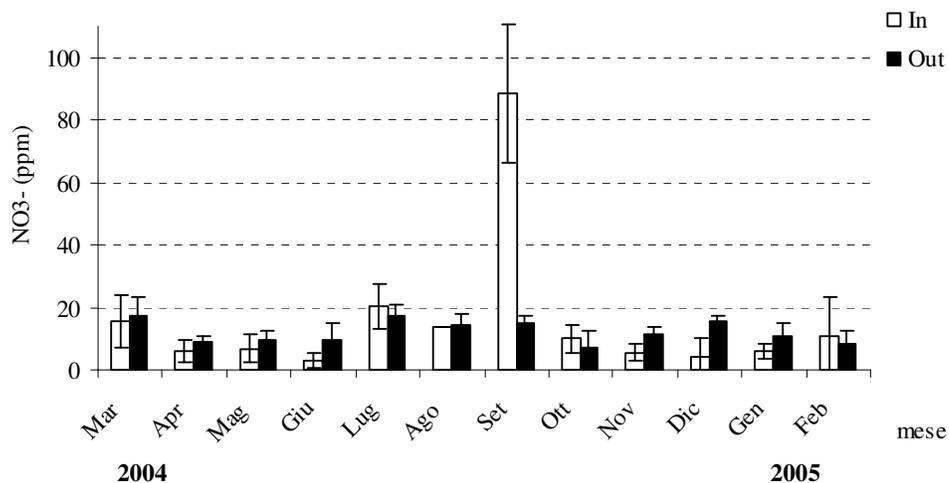
Nitrati

Dai risultati ottenuti durante il periodo di monitoraggio (grafico 12-13) si osserva l'assenza di un andamento ben preciso tra i valori di concentrazione osservati sul refluo in ingresso e sul refluo biotrasformato in uscita al sistema. Dall'ossidazione dell'ammoniaca e dei nitriti avremmo dovuto osservare un accumulo dei nitrati come accade per i fosfati. Tale aumento inoltre era auspicato, dovendo il refluo biotrasformato essere utilizzato come terreno di

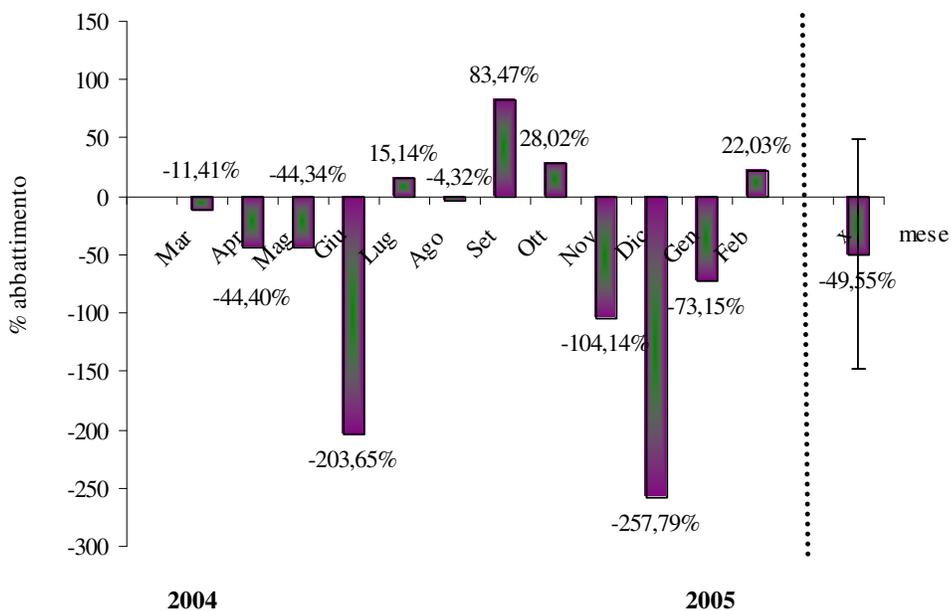


Foto 1. *Beggiatoa* spp.

coltura algale. Nei mesi da Aprile a Giugno si osserva in uscita un piccolo incremento della concentrazione dei nitrati, che non rispecchia la stechiometria del processo ossidativo che prevede dall'ossidazione di una mole di ammoniaca la formazione di 4 moli di nitrato (Saroglia, 2001).



Grafici 12. Andamento medio mensile e range di variabilità del nitrato (NO_3^-) valutato in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biosidchi durante l'anno di monitoraggio



Graf. 13. Andamento della percentuale d'abbattimento mensile dell' NO_3^- registrata durante l'anno di monitoraggio e media annuale ($\bar{x} \pm \sigma$)

Dall'andamento della percentuale d'abbattimento mensile del NO_3^- (graf.13) si può osservare la mancanza di un andamento ben preciso del nitrato; inoltre, anche nei mesi in cui si è registrato un accumulo di nitrati, questo in termini di quantità assoluta è sempre inferiore a quello aspettato.

Nei mesi di Luglio, Agosto e Settembre i valori valutati nel refluo biotrasformato sono sempre inferiori a quelli registrati nel refluo in ingresso, nonostante gli elevati apporti di ammoniaca e nitriti presenti in questo periodo per la fase di avvio chimica del biofilm.



Foto 2. Dettaglio dei biodischi ricoperti da *Beggiatoa spp.*

Il consumo di nitrati generalmente è legato negli impianti di depurazione biologica alla formazione nei filtri di zone anaerobiche dove batteri denitrificanti sono in grado di ridurre il nitrato a nitrito e successivamente ad azoto gassoso, che è allontanato per strippaggio (Saroglia, 2001).

Nel nostro caso il consumo dei nitrati è dovuto quasi certamente alla presenza di *Beggiatoa spp.* (foto 1), un solfobatterio marino di grosse dimensioni che forma colonie filamentose di colore bianco per le inclusioni di zolfo che riflettono la luce.

Tale specie, comparsa chiaramente sui biodischi a fine giugno (foto 2), è altamente infestante in condizioni dei bassi livelli di ossigeno disciolto (Fantei *et al.*, 1999) che si sono manifestati proprio a partire dal mese di Giugno (grafico 2A).

Fosfati

Dai risultati ottenuti durante il periodo di monitoraggio (grafico 14) si osserva la presenza costante dei fosfati sia in ingresso che in uscita al depuratore. La presenza e l'accumulo dei fosfati è per noi un dato positivo e desiderato, dato che, insieme all'azoto, il fosforo è uno dei nutrienti essenziali per la crescita di microalghe marine.

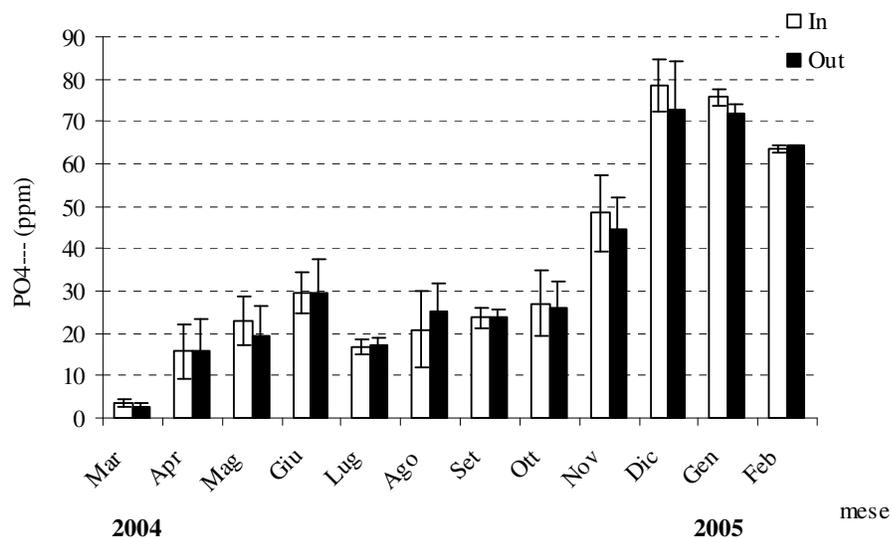


Grafico 14. Andamento medio mensile e range di variabilità del fosfato (PO_4^{3-}) valutato in ingresso ed in uscita al modulo di depurazione a biodischi durante l'anno di monitoraggio

In un impianto di depurazione convenzionale, che non sia stato progettato o gestito per la rimozione biologica del fosforo, i batteri utilizzano solo i fosfati necessari per le loro esigenze metaboliche, cosicché solo una piccola parte del fosforo si mostra rimossa, come evidente nel grafico 15 dove sono riportate le percentuali di abbattimento medie mensili per PO_4^{3-} . Negli impianti progettati per la rimozione biologica del fosforo viene favorito l'instaurarsi di un ambiente idoneo alla proliferazione di batteri capaci di accumulare fosforo in eccesso rispetto alle normali esigenze metaboliche: sono microorganismi in grado di accumulare ed immagazzinare all'interno delle loro cellule elevate quantità di fosfati, sottoforma di prodotti di accumulo relativamente insolubili.

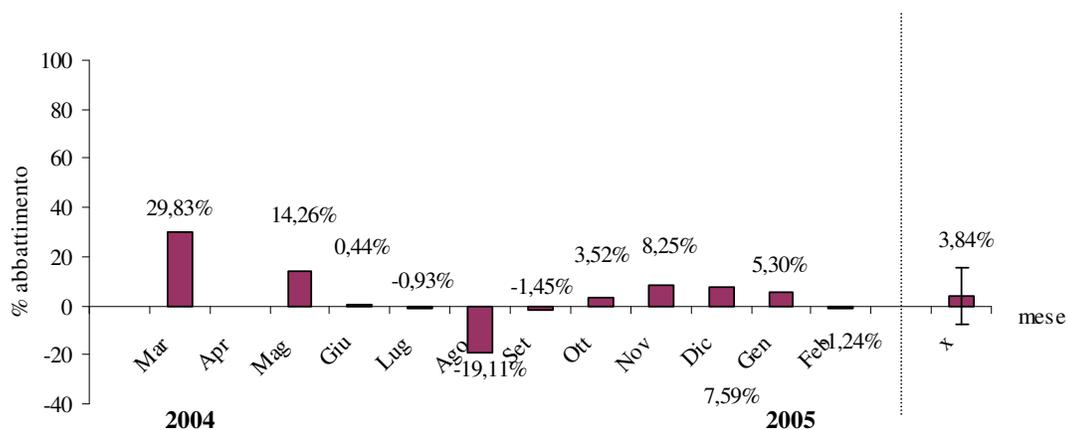


Grafico 15. Andamento della percentuale d'abbattimento mensile del PO_4^{3-} registrata durante l'anno di monitoraggio e media annuale ($\bar{x} \pm \sigma$)

Recupero del refluo biotrasformato e Test di crescita algale

Per valutare il recupero dei reflui d'acquacoltura mediante un sistema di depurazione a biodischi si è proceduto effettuando prove di crescita algale nel refluo biotrasformato.

Le specie algali utilizzate per il test sono *Tetraselmis suecica* ed *Isochrysis galbana*.

I test sono stati effettuati con cadenza mensile a partire dal mese di Aprile e fra di essi vi sono differenze sostanziali strettamente legate al variabile contenuto in N e P del refluo introdotto nel depuratore.

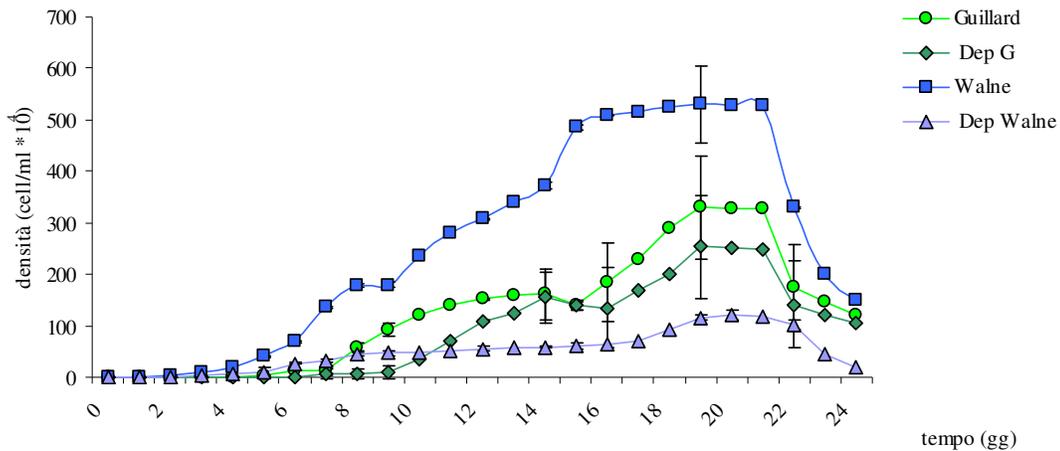
Il potenziale di crescita delle alghe è riportato per mese data la necessità di correlarlo con il contenuto nutritivo della soluzione ottenuta dalla depurazione del refluo d'acquacoltura.

Aprile

Nel mese di Aprile il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella IV, mostrando un rapporto N/P pari a 3,37. La quantità di N riscontrata nell'effluente biotrasformato è inferiore a quella presente sia nel terreno di Walne (N 1175,8 $\mu\text{mol/l}$, P 169 $\mu\text{mol/l}$), che in quello di F/2 Guillard (N 878 $\mu\text{mol/l}$, P 36,45 $\mu\text{mol/l}$), mentre la quantità di fosforo risulta essere superiore alla concentrazione presente nel terreno di Walne e minore a quello presente in F/2 Guillard. Nel grafico 16 è riportata la curva di crescita media di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente mediante camera di Bürker nei differenti mezzi di coltura. Come crescita di controllo è stata utilizzata quella registrata in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto da una parte un inoculo algale accresciuto nel terreno di Walne (Dep W) e dall'altra un inoculo algale accresciuto nel terreno F/2 Guillard (Dep G). La massima crescita algale (grafico 12) è stata registrata nel terreno di Walne, dove al 19° giorno è stata riscontrata una concentrazione algale ($530 \cdot 10^4 \pm 75,31$ cellule/ml) superiore a quella valutata in Guillard F/2 ($330 \cdot 10^4 \pm 100,3$ cellule/ml). Nel refluo biotrasformato dove sono state inoculate alghe accresciute nel terreno di Walne si è raggiunta una crescita algale pari a $120 \cdot 10^4 \pm 10,17$ cellule/ml, mentre per l'altro test, la densità algale raggiunta è stata di $252 \cdot 10^4 \pm 100,3$ cellule/ml. Il dato registrato non stupisce visto il maggior contenuto in nutrienti presenti nel terreno di Walne. Le crescite registrate nel refluo in cui sono stati introdotti due diversi tipi di inoculo non sono sostanzialmente differenti se si tengono in considerazione le deviazioni standard valutate per i due gruppi, per cui per i test algali successivi è stato utilizzato un solo tipo di inoculo accresciuto in Walne.

Tabella IV. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	0,114	N= 185
NO_2^-	0,0928	
NO_3^-	11,00	
PO_4^{3-}	5,2	P= 54,88



Graf. 16. Media e range di variabilità della crescita algale di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo biotrasformato – con due diversi inoculi - nel mese di Aprile

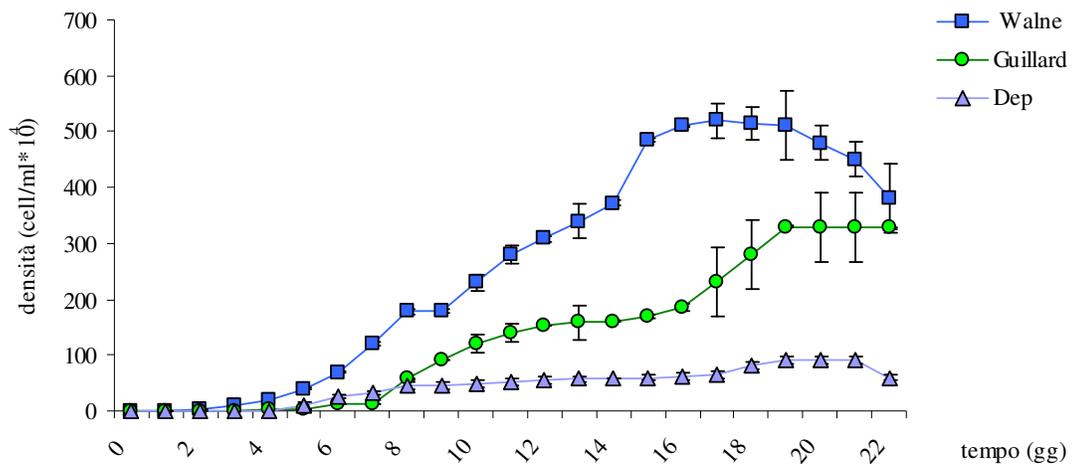
Maggio

Nel mese di Maggio il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella V, mostrando un rapporto N/P pari a 0,73. La quantità di N riscontrata nel refluo biotrasformato è inferiore a quella presente sia nel terreno di Walne (N 1175,8 $\mu\text{mol/l}$, P 169 $\mu\text{mol/l}$), che in quello di F/2 Guillard (N 878 $\mu\text{mol/l}$, P 36,45 $\mu\text{mol/l}$), mentre la quantità di fosforo risulta ottimale e addirittura superiore alla concentrazione presente nei terreni standard. Nel grafico 17 è riportata la curva di crescita media di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente mediante camera di Bürker nei differenti terreni di coltura. Come crescita di controllo è stata utilizzata quella registrata in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto un inoculo algale accresciuto nel terreno di Walne. La massima crescita algale è stata registrata nel

terreno di Walne, dove al 18° giorno è stata riscontrata una concentrazione algale ($515 \cdot 10^4 \pm 61,75$ cellule/ml) 1,6 volte superiore a quella valutata in Guillard F/2 ($330 \cdot 10^4 \pm 1,15$ cell/ml) e 6 volte superiore a quella osservata nel refluo biotrasformato ($91 \cdot 10^4 \pm 5,17$ cellule/ml). Il dato registrato sottolinea il maggior contenuto in nutrienti presenti nel terreno di Walne.

Tabella V. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	0,08	N= 151
NO_2^-	0,24	
NO_3^-	8,74	P= 207
PO_4^{3-}	19,7	



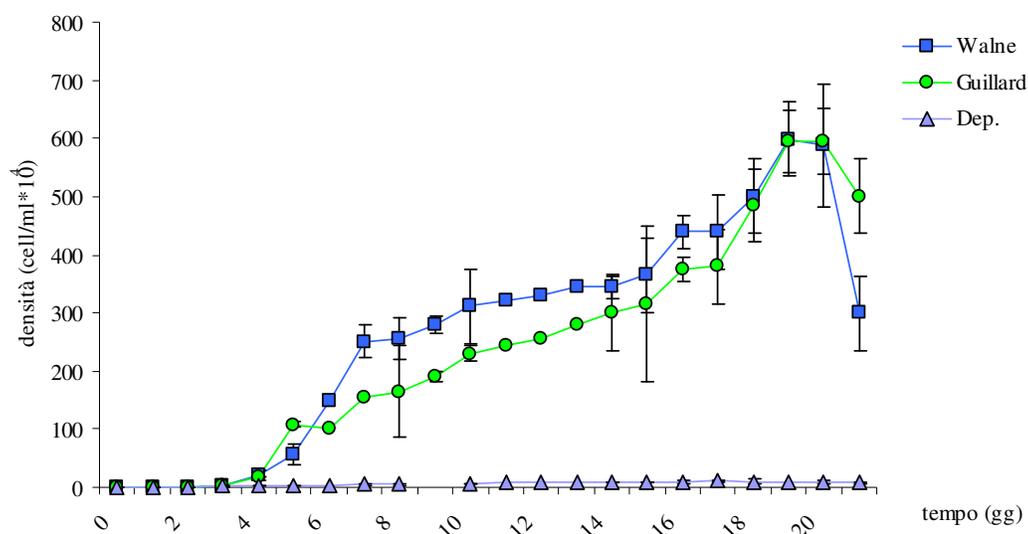
Graf.17 Media e range di variabilità della crescita algale di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo biotrasformato nel mese di Maggio

Giugno

Nel mese di Giugno il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella VI, mostrando un rapporto N/P pari a 1,16. Nel grafico 18 è riportata la curva di crescita media di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente mediante camera di Burkner nei differenti terreni di coltura. Come crescita di controllo sono stati utilizzate quelle registrate in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto un inoculo algale accresciuto nel terreno di Walne. La massima crescita algale è stata registrata nel terreno di Walne, dove al 19° giorno è stata riscontrata una concentrazione algale ($599 \cdot 10^4 \pm 63,64$ cell/ml) pari a quella valutata in Guillard F/2 ($595 \cdot 10^4 \pm 53,64$ cell/ml) e 55 volte superiore a quella osservata nel refluo biotrasformato ($10,77 \cdot 10^4 \pm 2,33$ cell/ml). Il dato registrato è dovuto al maggior contenuto in N presente nel terreno di Walne.

Tabella VI. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	2,79	N= 289
NO_2^-	0,019	
NO_3^-	1,245	P= 248
PO_4^{3-}	7,7	



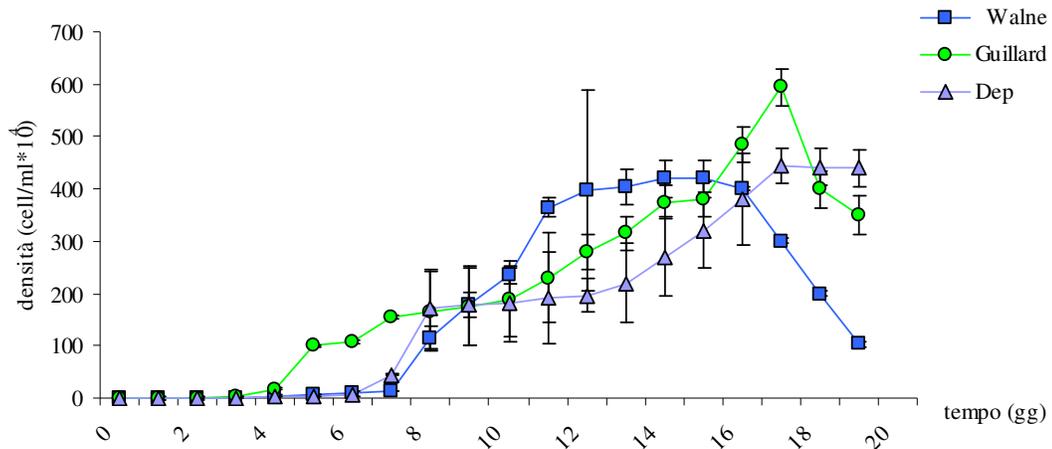
Graf 18. Media e range di variabilità della crescita algale di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo depurato nel mese di Giugno

Luglio

Nel mese di Luglio il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella VII, mostrando un rapporto N/P pari a 0,842. Nel grafico 19 è riportata la curva di crescita media di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente mediante camera di Bürker nei differenti terreni di coltura. Come crescita di controllo sono state utilizzate quelle registrate in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto un inoculo algale, accresciuto nel terreno di Walne. La massima crescita algale è stata registrata nel terreno di Guillard F/2 ($595 \cdot 10^4$ cell/ml \pm 35,35). La maggiore crescita algale registrata nel refluo biotrasformato ($445 \cdot 10^4$ cell/ml \pm 33,23) è da imputare a un aumento nel contenuto di N e P, legato all'utilizzo di sali per la fase chimica di avvio del biofiltro.

Tabella VII. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	4,14	N= 459
NO_2^-	0,0013	
NO_3^-	13,39	
PO_4^{3-}	16,9	P= 545



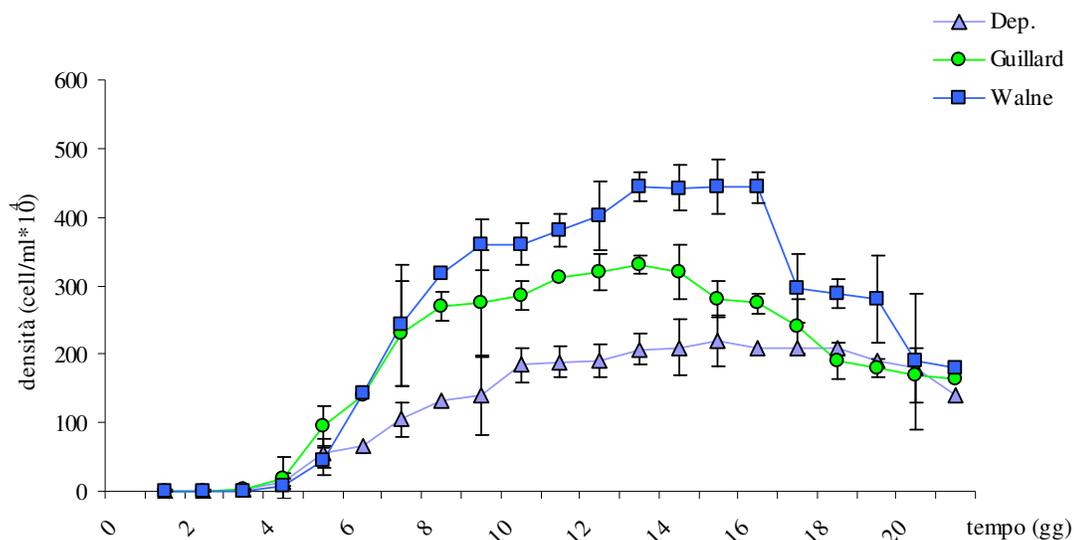
Graf 19. Media e range di variabilità della crescita algale di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo biotrasformato nel mese di Luglio

Settembre

Nel mese di Settembre il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella VIII, mostrando un rapporto N/P pari a 1,15. Nel grafico 20 è riportata la curva di crescita media di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente mediante camera di Burkner nei differenti terreni di coltura. Come crescita di controllo sono state utilizzate quelle registrate in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto un inoculo algale accresciuto nel terreno di Walne. La massima crescita è stata registrata nel terreno di Walne ($444 \cdot 10^4$ cell/ml \pm 33,37), mentre nel refluo biotrasformato si è raggiunta una concentrazione pari a $219 \cdot 10^4$ cell/ml \pm 41,3. Nel terreno di Guillard F/2 si registra una concentrazione intermedia ($330 \cdot 10^4$ cell/ml \pm 24,33).

Tabella VIII. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	0,0013	
NO_2^-	0,015	287
NO_3^-	17,78	
PO_4^{3-}	23,74	250



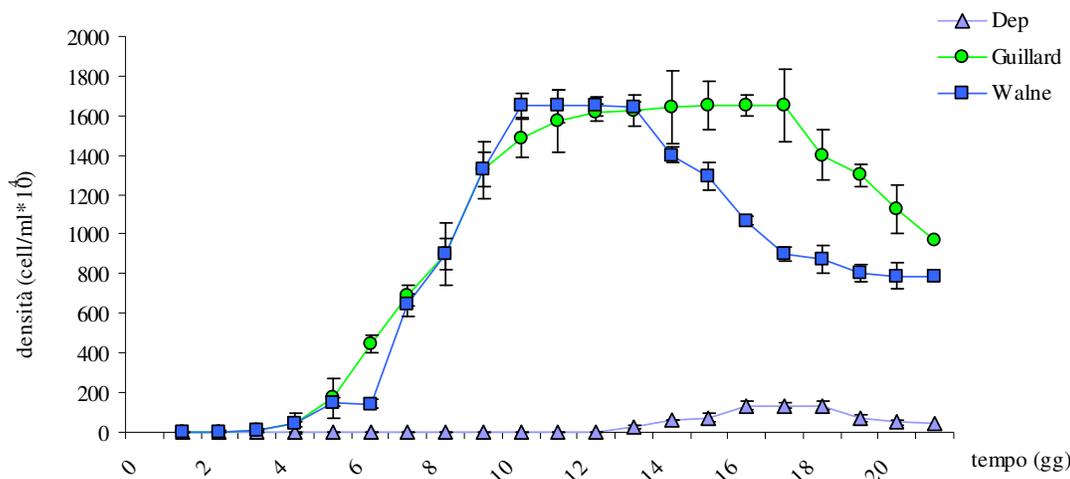
Graf. 20. Media e range di variabilità della crescita algale di *Tetraselmis suecica* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo biotrasformato nel mese di Settembre.

Ottobre

Nel mese di Ottobre il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella IX, mostrando un rapporto N/P pari a 1,48. In tale mese è stato effettuato il test algale con *Isochrysis galbana*. In grafico 21 è riportata la curva di crescita media di *Isochrysis galbana* valutata giornalmente mediante camera di Burkler nei differenti terreni di coltura. Come crescita di controllo sono state utilizzate quelle registrate in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto un inoculo algale accresciuto nel terreno di Walne. La massima crescita è stata registrata nel terreno di Guillard F/2 ($1650 \cdot 10^4$ cell/ml) e in quello di Walne ($1650 \cdot 10^4$ cell/ml), mentre nel refluo biotrasformato si è raggiunta una concentrazione pari a $132 \cdot 10^4$ cell/ml.

Tabella IX. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	4,24	407
NO_2^-	1,96	
NO_3^-	7,12	275
PO_4^{3-}	26,15	



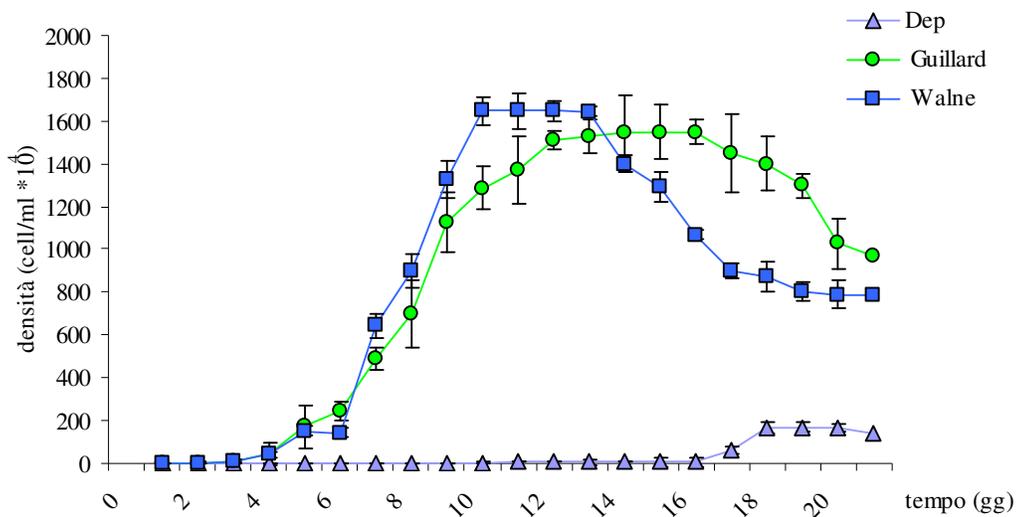
Graf. 21. Media e range di variabilità della crescita algale di *Isochrysis galbana* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo biotrasformato nel mese di Ottobre.

Dicembre

Nel mese di Dicembre il refluo biotrasformato presentava un contenuto di azoto e fosforo come da tabella X, mostrando un rapporto N/P pari a 0,74. In tale mese è stato effettuato il test algale con *Isochrysis galbana*. Nel grafico 18 è riportata la curva di crescita media di *Isochrysis galbana* valutata giornalmente mediante camera di Burkler nei differenti terreni di coltura. Come crescita di controllo sono state utilizzate quelle registrate in due tipi di terreno (Walne e Guillard F/2) e nel refluo biotrasformato è stato introdotto un inoculo algale accresciuto nel terreno di Walne. La massima crescita è stata registrata nel terreno di Walne ($1646,7 \cdot 10^4$ cell/ml \pm 83,5) e in quello di Guillard F/2 ($1550 \cdot 10^4 \pm 181$ cell/ml), mentre nel refluo biotrasformato si è raggiunta una concentrazione pari a $140 \cdot 10^4 \pm 15$ cell/ml.

Tabella X. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	4,99	430
NO_2^-	0,1	
NO_3^-	8,40	
PO_4^{3-}	55,3	582



Graf. 22. Media e range di variabilità della crescita algale di *Isochrysis galbana* valutata giornalmente nel terreno di Walne, di Guillard F/2 e del refluo biotrasformato nel mese di Dicembre.

Dicembre e Febbraio

Nei mesi di Dicembre e Febbraio per valutare se le basse crescite algali, registrate nel refluo biotrasformato, sono legate a carenza di Fe (metallo essenziale nel processo fotosintetico), a carenze di N o alla presenza di sostanze tossiche – limitanti la crescita algale - è stato effettuato un test di crescita algale aggiungendo in tre beute da 300 ml cloruro di ferro (nelle quantità presenti nel terreno di Walne), in altre 3 nitrato di sodio ed in altre tre beute da 300 ml tutti i nutrienti del terreno di Walne - nelle stesse quantità.

I risultati ottenuti di massima crescita di *Isochrysis galbana* sono riportati in tabella XI. Come crescita di controllo è stata utilizzata quella registrata in Guillard F/2 e in Walne.

Tabella XI: Crescita di *Isochrysis galbana* registrata nei terreni standard (Guillard F/2 e Walne) e nel refluo biotrasformato con aggiunte di diversi nutrienti

Soluzione testata	Concentrazione algale (*10 ⁴ cell/ml)	
	Dicembre	Febbraio
Controllo – Guillard F/2	1550± 181	1374,98 ± 165,01
Controllo Walne	1646,7 ± 83,5	1274,98 ± 135,01
Dep tq	140± 15	126 ± 0,42
Dep tq + FeCl₃	47 ± 15,20	262 ± 10,60
Dep tq + N	280 ± 35,01	243,75 ± 37,12
Dep tq + tutto	1298 ± 38	1035 ± 77,78

Dai risultati ottenuti si evince che il refluo biotrasformato non presenta sostanze tossiche per la crescita delle microalghe considerate, visto che, se utilizzato come base per un terreno di coltura algale standard, è possibile ottenere concentrazioni algali paragonabili a quelle osservate nei terreni standard (Walne e Guillard F/2) (tabella XI). Per cui anche se nel refluo biotrasformato - tal quale – le concentrazioni algali raggiunte non sono apprezzabili, si può sempre ipotizzare di riutilizzare tale refluo come base per un terreno di coltura algale standard.

Se si osserva la concentrazione algale raggiunta nel refluo biotrasformato con aggiunta di N e Fe si osserva un incremento della densità cellulare rispetto al refluo biotrasformato utilizzato tal quale, ma tale incremento non è sostanziale o tale da giustificare la ridotta concentrazione algale registrata nel refluo tal quale. Se si osserva la concentrazione dei nutrienti nel refluo biotrasformato (tabella XI e XII) è possibile notare che da Dicembre a Febbraio il rapporto N/P passa da 0,74 a 0,59 con un leggero decremento dell’N (430

$\mu\text{mol/l}$ a $396 \mu\text{mol/l}$) e un incremento del P ($582 \mu\text{mol/l}$ a $675 \mu\text{mol/l}$). Le variazioni nel contenuto in azoto e fosforo sono tali da non indurre grosse differenze di crescita algale nel refluo tal quale.

Tabella XII. Contenuto in N e P del refluo biotrasformato utilizzato come terreno di coltura algale

Nutrienti investigati	Quantità (ppm)	$\mu\text{mol/l}$
NH_3^+	4,91	396
NO_2^-	0,56	
NO_3^-	5,95	
PO_4^{3-}	64,13	675

3.5 Correlazione tra contenuto in nutrienti del refluo biotrasformato e crescita algale

Al fine di valutare il possibile utilizzo del refluo biotrasformato come terreno di coltura di microalghe marine (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*) sono state riportate con cadenza mensile le curve di crescita di dette alghe e la concentrazione in nutrienti registrata nel refluo biotrasformato (par. 3.4).

I dati ottenuti sono stati correlati tra di loro per definire se la concentrazione delle diverse forme azotate indagate risultava essere correlata positivamente alla massima crescita microalgale registrata. Da evidenze sperimentali è infatti noto che la crescita algale è strettamente legata alla presenza di nutrienti quali N e P, e i test algali effettuati sono altamente utilizzati nella determinazione della biodisponibilità di N e P (Hammouda *et al.*, 1994). Per poter interpretare i risultati ottenuti è innanzitutto necessario comprendere quella che è l'attività metabolica del fitoplancton.

La fotosintesi fornisce al fitoplancton energia e composti quali O, C e H, ma la cellula algale per incrementare la propria biomassa e compiere la propria attività metabolica ha bisogno anche di altri composti, che è possibile dividere in macronutrienti e micronutrienti. I macronutrienti, che rappresentano lo 0,1% di materia organica, sono: Ca, K, Mg, N, P, S, Cl e Si (per le diatomee). I micronutrienti, che sono necessari solo in piccole quantità - ma risultano essere indispensabili per l'attività metabolica del fitoplancton - sono: Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, B, V, Se.

In molti casi l'assimilazione di tali nutrienti si attua mediante un sistema di trasporto ionico attivo contro gradiente di concentrazione, un processo che richiede energia - generalmente accumulata mediante il processo fotosintetico e respiratorio.

Alcuni elementi possono essere assimilati sia in forma organica che inorganica. Nel caso del fosforo, gli esteri fosfati disciolti sono idrolizzati all'esterno della cellula ad opera di specifici enzimi (Tillmann e Rick, 2001) e solo successivamente le cellule assorbono unicamente gli ioni fosfato. Il nitrato (azoto nitrico), il nitrito (azoto nitroso) e l'ammoniaca sono le forme di azoto inorganico più comunemente fissate in natura.

E' interessante ricordare come la presenza e la concentrazione delle varie forme dell'azoto indagati nel refluo, biotrasformato e non, così come anche in natura, non siano fisse nel tempo, ma costituiscono il risultato dell'attività metabolica complessiva di tutte le forme di batteri nitrificanti, che per le loro esigenze metaboliche convertono una forma dell'azoto in un'altra in un complesso di reazioni che nella loro totalità costituiscono un processo ciclico (ciclo dell'azoto). Fra tutte le forme inorganiche dell'azoto, l'ammonio NH_4^+ , riveste un'importanza fondamentale per tutti gli organismi azoto autotrofi, perchè è la sola forma chimica sotto la quale l'azoto può essere utilizzato per il processo di organizzazione, e pertanto costituisce un nutrimento assolutamente necessario per i vegetali. La quantità di ammonio di cui i vegetali hanno bisogno per una adeguata nutrizione e quindi una normale crescita è considerevole. Pertanto i vegetali devono trovare nel mezzo in cui vivono una adeguata disponibilità di azoto ammoniacale o comunque di composti dell'azoto da poter facilmente convertire in ammoniaca, come il nitrato, altrimenti essi andranno incontro a carenza di azoto e quindi a limitazione nella crescita.

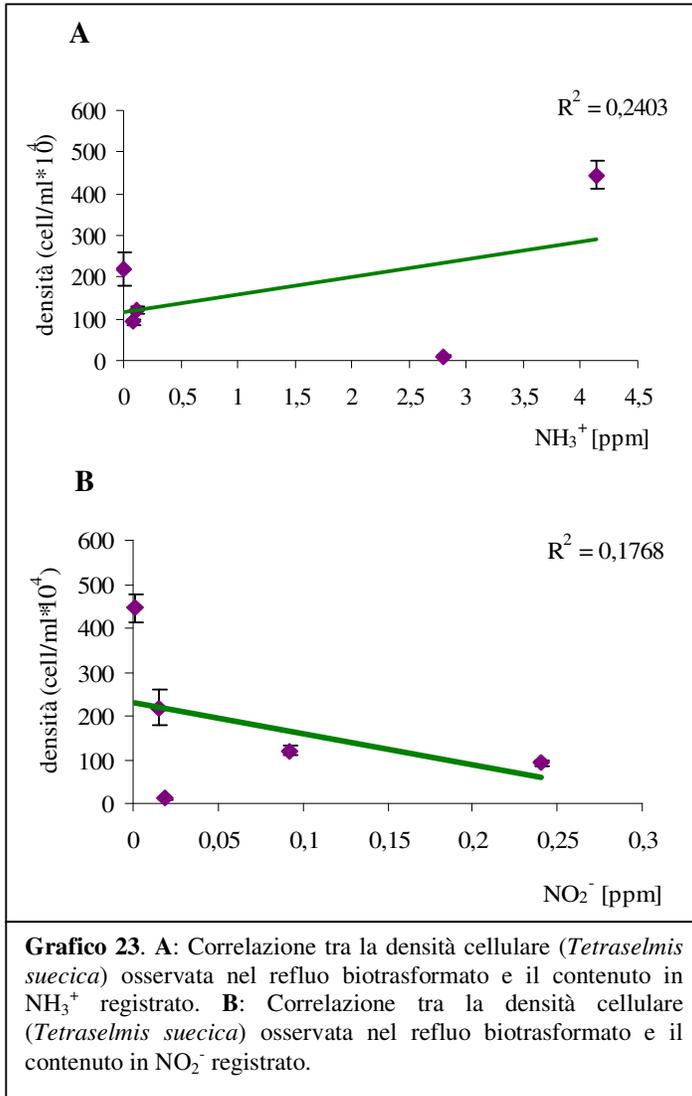
Il nitrato presente nel refluo biotrasformato è prodotto dai batteri nitrificanti, e anche in natura risulta infine che il nitrato finisce con il rappresentare la principale fonte di azoto per i vegetali, che lo possono utilizzare grazie alla loro capacità di convertirlo rapidamente in ammoniaca che, come già sappiamo, rappresenta la sola forma dell'azoto direttamente utilizzabile per la sintesi della glutammina e del glutammato nel processo di organizzazione dell'azoto. L'assorbimento del nitrato da parte della cellula algale avviene ad opera di specifiche permeasi di membrana, che permettono alle alghe fitoplanctoniche, che vivono in ambiente marino (notoriamente povero di nitrato e di altri composti azotati) di utilizzarli (Alpi *et al.*, 1992). Da qui se ne deduce che nell'assimilazione del nitrato si attua un dispendio energetico supplementare dovuto alla sua riduzione a ione ammonio una volta entrato nella cellula. E' generalmente assunto che in presenza delle due forme inorganiche

dell'N (NH_4^+ e NO_3^-), l'ammonio è preferenzialmente usato da parte delle microalghe e l'assorbimento dell'ammonio inibisce l'assorbimento/assimilazione del nitrato. Quindi è spesso assunto che la completa inibizione dell'assimilazione del nitrato avviene a una concentrazione di $\text{NH}_4^+ > 1 \mu\text{M}$. Lomas e Glibert (1999) hanno dimostrato che l'assorbimento/assimilazione del nitrato sembra diminuire in modo esponenziale all'aumentare della concentrazione dell' NH_4^+ , pur non osservando una completa inibizione a concentrazioni elevate di NH_4^+ di circa $200 \mu\text{M}$. Le curve di crescita algale registrate si sono ottenute in un periodo di circa 17 giorni, per cui nel nostro caso le alghe dopo aver esaurito l'ammonio come fonte di N hanno utilizzato il nitrato.

Alla luce di quanto esposto ben si comprende perchè anche i terreni standard utilizzati per le colture algali contengono nitrato e non ammonio. La presenza diretta di ammonio da numerosi problemi nel giusto accrescimento delle popolazioni algali, probabilmente dovuti alle elevate velocità di crescita. Inoltre la presenza del nitrato comunque rispecchia quella che è la situazione registrata in natura.

Tetraselmis suecica

Le concentrazioni di ammoniaca e nitriti non risultano essere correlate con la densità cellulare di *Tetraselmis suecica* raggiunta nel refluo biotrasformato (grafico 23), mentre per i nitrati si è evidenziata un indice di correlazione lineare R^2 di 0,47. L'assenza di correlazione nel primo caso è dovuta alla scarsa presenza di ammonio, e alle elevate concentrazioni di nitrato. La correlazione negativa tra la concentrazione di nitrito e le densità algali raggiunte sono dovute al fatto che l'azoto nitroso rappresenta una forma tossica di N per gli organismi acquatici in generale e soprattutto per la fauna ittica, a causa della sua capacità ossidante. L'indice di correlazione tra la concentrazione di nitrato e le densità algali raggiunte si approssima ad 1 (0,9919) eliminando il risultato registrato nel mese di Luglio (grafico 24), in cui la maggiore densità algale registrata è da imputare alla più elevata concentrazione di NH_3^+ presente (4,14 ppm).



Alla luce di quanto esposto la correlazione tra nitrato e crescita algale di *Tetraselmis suecica* registrata nel refluo biotrasformato riflette i processi metabolici fin qui descritti.

Numerosi sono gli studiosi che ritengono che la crescita algale dipenda unicamente dal contenuto in N - che è generalmente il fattore limitante la crescita algale in ambiente acquatico marino - indipendentemente dalla forma organica in cui questo è presente.

E' stata quindi valutata la correlazione esistente tra il contenuto totale di N (espresso come μmol/l) e la crescita algale registrata nel refluo biotrasformato (grafico 25).

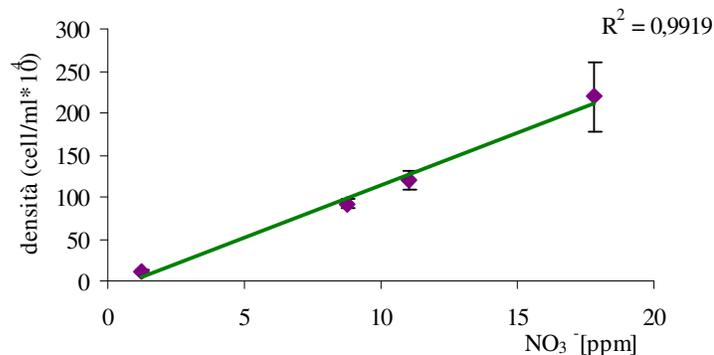
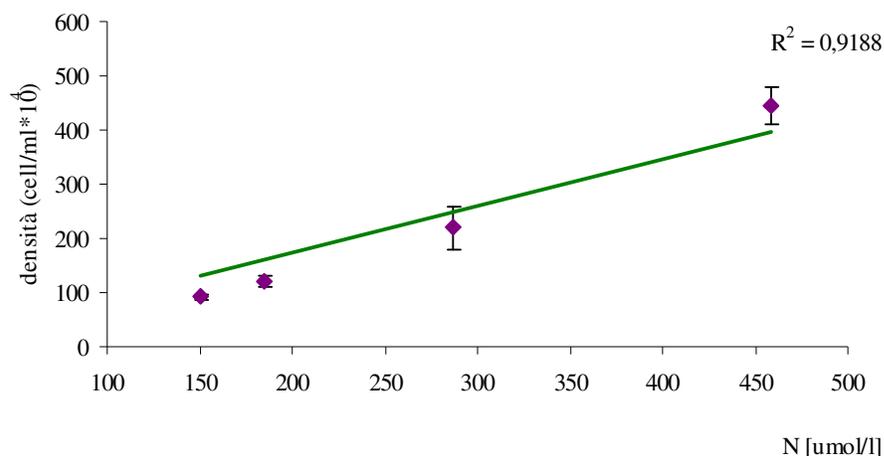


Grafico 24. Correlazione tra la densità cellulare (*Tetraselmis suecica*) osservata nel refluo biotrasformato e il contenuto in NO₃⁻ registrato senza considerare il valore registrato nel mese di Luglio.

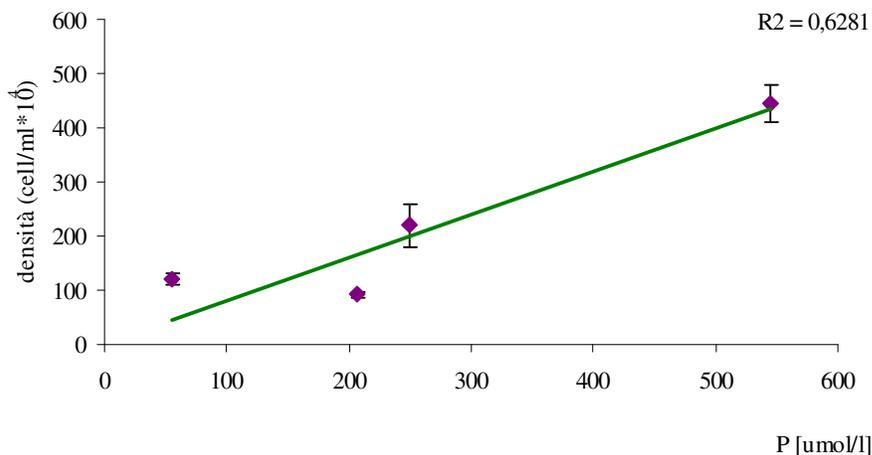


Graf. 25. Correlazione tra la densità cellulare (*Tetraselmis suecica*) osservata nel refluo biotrasformato e il contenuto in N [µmol/l] totale

L'indice di correlazione ha un valore pari a 0,9188.

Se si osserva la correlazione tra N/P e la densità algale registrata nel refluo biotrasformato si evince che non c'è correlazione, e che la crescita algale è direttamente proporzionale alla quantità di NO_3^- e N totale presenti, ma non al rapporto tra nutrienti quali N e P. Ciò è legato al fatto che l'N è il fattore limitante la crescita algale, mentre il P è sempre presente in concentrazioni elevate e sufficienti per *Tetraselmis suecica*.

E' possibile evidenziare una correlazione lineare tra la concentrazione di fosfato presente nel refluo biotrasformato e la densità algale raggiunta (grafico 26).



Graf. 26. Correlazione tra la densità cellulare (*Tetraselmis suecica*) osservata nel refluo biotrasformato e la concentrazione in P [µmol/l].

Isochrysis galbana

I dati raccolti per *Isochrysis galbana* risultano insufficienti per poter definire una correlazione corretta tra le densità cellulari osservate sperimentalmente e la concentrazione dei nutrienti. La carenza di tali dati è dovuta a fenomeni di contaminazione delle colture da parte di altre specie microalgali. Le correlazioni osservate (grafico 27 A e B) sono le stesse osservate per *Tetraselmis suecica*. Ciò non fa altro che confermare quanto prima discusso.

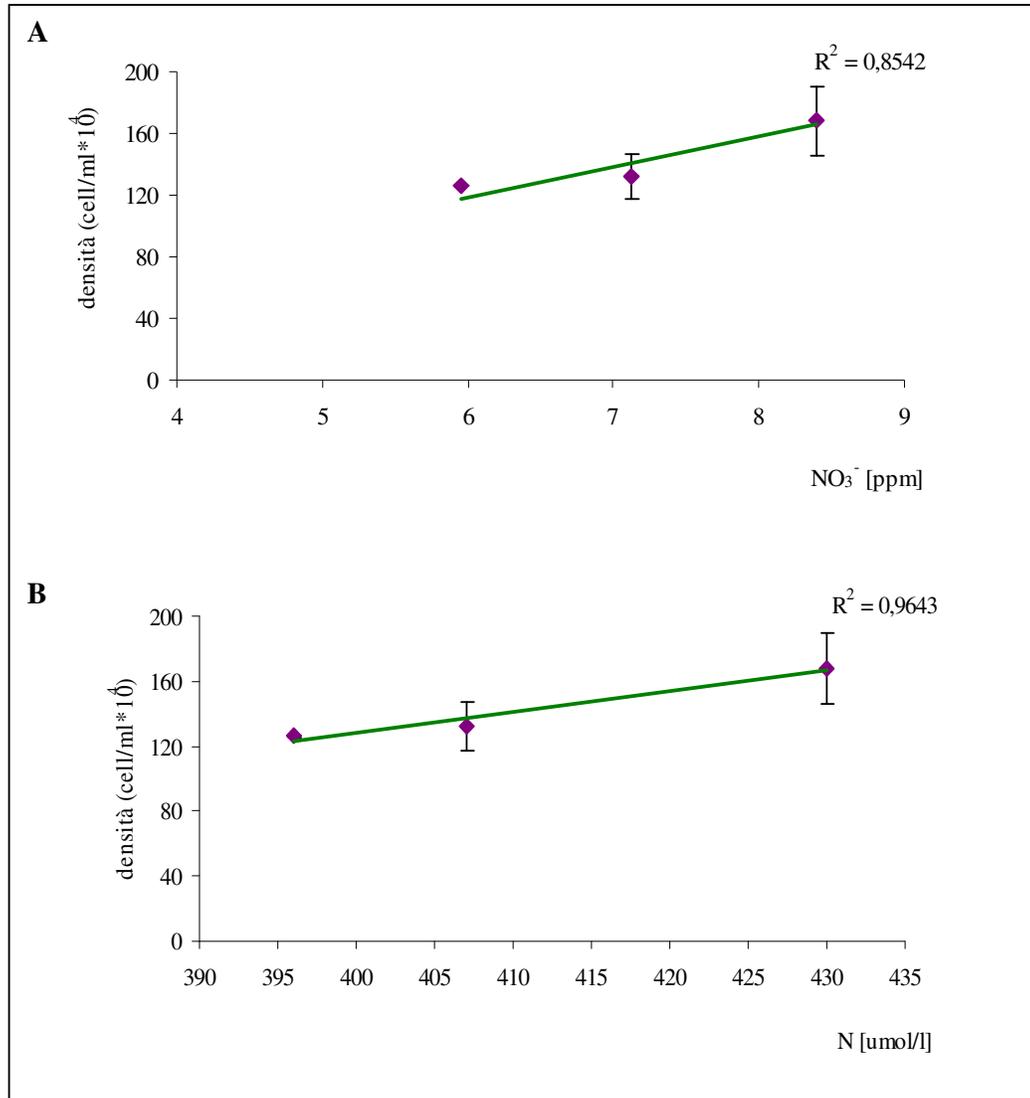


Grafico 27. A: Correlazione tra la densità cellulare (*Isochrysis galbana*) osservata nel refluo biotrasformato e il contenuto in NO₃⁻ registrato. **B:** Correlazione tra la densità cellulare (*Isochrysis galbana*) osservata nel refluo biotrasformato e il contenuto in N totale registrato.

3.6 Valore nutrizionale delle microalghe utilizzate nella sperimentazione

Al fine di valutare il contenuto nutrizionale delle microalghe accresciute nel refluo depurato (*T. suecica dep* e *I. galbana dep*) si è proceduto stimandone il contenuto in proteine, carboidrati e acidi grassi e paragonando i valori ottenuti con quelli registrati per le stesse specie algali coltivate nel terreno standard di Walne (*T. suecica st.* e *I. galbana st.*). Le condizioni di allevamento sono state: temperatura di 20°C, luminosità continua pari a 4.500 – 5000 lux e salinità del 36‰.

Secondo diversi autori il valore nutrizionale delle microalghe marine è specie specifico ma anche legato all'età della coltura, alle condizioni di allevamento (temperatura, illuminazione, nutrimenti forniti, ecc.) e alla fase di raccolta (James *et al.*, 1989; Parrish e Wangersky, 1990; Tsuzuki *et al.*, 1990; Ahlgren *et al.*, 1992; Alonso *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1997).

I campioni sono stati prelevati con cadenza settimanale per entrambe le specie per un periodo di circa 4 mesi al fine di ottenere un risultato statisticamente valido data soprattutto l'elevata variabilità in nutrienti del refluo biotrasformato.

3.6.1 Acidi grassi

Dai dati riportati in letteratura, risulta che per le microalghe marine le differenze più significative sono dovute alla diversa composizione in acidi grassi essenziali, soprattutto quelli altamente poliinsaturi (HUFA) della serie ω 3, fondamentali per il metabolismo delle specie allevate (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989).

Il contenuto in acidi grassi saturi, monoinsaturi, poliinsaturi e i principali indici di composizione sono riportati nelle tabelle XIII, XIV, XV, XVI.

Tabella XIII. Composizione in acidi grassi saturi (wt %: dry basis) - medie e range di variabilità - di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel terreno di Walne (st) e nel refluo biotrasformato (dep)

Acidi grassi saturi	<i>Tetraselmis suecica</i> st.	<i>Tetraselmis suecica</i> dep.	<i>Isochrysis galbana</i> st.	<i>Isochrysis galbana</i> dep
C10:0	0,69 ± 0,01	0,18 ± 0,12	0,7 ± 0,06	0,08 ± 0,02
C12:0	0,60 ± 0,28	0,17 ± 0,11	0,10 ± 0,1	0,07 ± 0,02
C13:0	0,63 ± 0,14	0,13 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,03
C14:0	0,45 ± 0,24	0,36 ± 0,17	17,85 ± 0,45	9,65 ± 4,52
C15:0	0,055 ± 0,007	0,08 ± 0,03	0,45 ± 0,003	0,27 ± 0,09
C16:0	22,32 ± 0,30	19,6 ± 9,76	12,55 ± 0,03	10,04 ± 1,39
C17:0	0,25 ± 0,06	0,33 ± 0,14	0,37 ± 0,07	0,44 ± 0,26
C18:0	1,71 ± 0,33	1,95 ± 1,16	0,63 ± 0,12	0,83 ± 0,81
C20:0	0,29 ± 0,01	0,13 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,29 ± 0,16
C22:0	0,24 ± 0,09	0,11 ± 0,06	0,36 ± 0,004	0,29 ± 0,23
C24:0	-	0,15 ± 0,09	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,12
*ΣSFA %	27,23 ± 1,56	23,19 ± 4,27	32,77 ± 0,93	22,31 ± 4,82

*ΣSFA = somma acidi grassi saturi

Isochrysis galbana st. presenta un maggior contenuto in acidi grassi saturi ($32,77 \pm 0,93$) rispetto a *Tetraselmis suecica* st. ($27,23 \pm 1,56$), come riportato già in numerosi lavori scientifici (Otero e Fabregas, 1997; Renauld *et al.*, 1999; Renauld *et al.*, 2002). Tale differenza è legata alla maggior presenza in *Isochrysis galbana* st. dell'acido miristico (C14:0). Gli acidi grassi saturi maggiormente rappresentati in *Tetraselmis suecica* st. sono C16:0 e C18:0 (Impiccini *et al.*, 1996), mentre in *Isochrysis galbana* st. sono l'acido miristico e il palmitico.

La ΣSFA% osservata in *T. suecica* dep ($23,19 \pm 4,27$) non risulta significativamente differente dal valore riscontrato nelle alghe coltivate nel terreno standard ($27,23 \pm 1,56$), mentre per *I. galbana* dep la situazione risulta opposta. In *I. galbana* dep si è evidenziato una riduzione nel contenuto di C14:0. In realtà se si esaminano i valori di ΣSFA% delle due specie algali coltivate nel refluo biotrasformato si osserva che tra di loro non è presente una differenza significativa, inoltre alla luce delle pari condizioni di allevamento le differenze emerse sono da imputare al differente contenuto nutrizionale del mezzo di accrescimento utilizzato.

Tabella XIV. Composizione in acidi grassi monoinsaturi (wt %: dry basis) - medie e range di variabilità - di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel terreno di Walne (st) e nel refluo biotrasformato (dep)

Acidi grassi monoinsaturi	<i>Tetraselmis suecica</i> st.	<i>Tetraselmis suecica</i> dep.	<i>Isochrysis galbana</i> st.	<i>Isochrysis galbana</i> dep
C14:1	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,08
C16:1n-3	0,19 ± 0,16	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,12 ± 0,06
C16:1n-7	1,12 ± 0,01	0,45 ± 0,10	3,46 ± 0,03	3,33 ± 0,49
C16:1n-9	0,95 ± 0,29	1,93 ± 0,65	0,13 ± 0,03	0,43 ± 0,27
C17:1	0,15 ± 0,08	0,13 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,49 ± 0,10
C18:1t	0,12 ± 0,04	0,35 ± 0,14	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,07
C18:1n-7	3,2 ± 0,01	2,44 ± 0,47	1,68 ± 0,06	1,73 ± 1,17
C18:1n-9	29 ± 12,06	26,32 ± 8,94	23,58 ± 1,81	23,11 ± 7,17
C20:1n-9	0,21 ± 0,01	0,96 ± 0,13	0,04	0,06 ± 0,03
C24:1	-	0,12 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,32 ± 0,24
ΣMUFA %	35,02 ± 12,67	33,86 ± 9,92	29,85 ± 2,06	29,79 ± 7,34

ΣMUFA = somma acidi grassi monoinsaturi

Gli acidi grassi monoinsaturi (tab. XIV) sono presenti a concentrazioni non significativamente dissimili nei quattro gruppi di alghe esaminate. In *Tetraselmis suecica* si osserva una maggiore abbondanza in C18:1n-7 e in C18:1n-9, mentre in *Isochrysis galbana* oltre ai suddetti si riscontra una buona presenza anche di C16:1n-7 (Renauld *et al.*, 1999). I valori riscontrati nel presente lavoro di ricerca non si discostano da quelli riportati in letteratura (Montaini *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1999), che sottolineano comunque una elevata variabilità inter e intraspecifica.

Tabella XV. Composizione in acidi grassi poliinsaturi (wt %: dry basis) - medie e range di variabilità - di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel terreno di Walne (st) e nel refluo biotrasformato (dep)

Acidi grassi poliinsaturi	<i>Tetraselmis suecica st.</i>	<i>Tetraselmis suecica dep.</i>	<i>Isochrysis galbana st.</i>	<i>Isochrysis galbana dep</i>
C16:2n-7	0,29 ± 0,23	0,27 ± 0,25	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,04
C18:2 tt	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03	0,06 ± 0,03
C18:2 ct	0,13 ± 0,05	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02
C18:2n-6	4,46 ± 1,07	5,64 ± 3,47	4,93 ± 0,07	7,84 ± 2
C18:3n-3	20,72 ± 0,18	7,58 ± 2,05	5,22 ± 0,17	4,11 ± 0,90
C18:3n-6	0,30 ± 0,13	0,88 ± 1,01	0,36	1,16 ± 0,36
C18:4n-3	7,24 ± 0,07	3,03 ± 0,66	11,15 ± 0,04	10,22 ± 4,42
C20:3n-6	-	0,10 ± 0,05	0,51 ± 0,03	0,61 ± 0,31
C20:4n-6	0,36 ± 0,31	1,29 ± 0,89	0,62 ± 0,10	0,63 ± 0,43
C20:5n-3	5,15 ± 0,06	6,49 ± 1,06	0,63	0,81 ± 0,50
C22:4	-	0,05 ± 0,02	0,19	0,15 ± 0,08
C22:5n-3	-	0,02 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,14 ± 0,04
C22:5n-6	-	0,08 ± 0,04	1,05 ± 0,01	0,85 ± 0,49
C22:6n-3	-	0,02 ± 0,04	6,41 ± 0,40	7,67 ± 3,45
^cΣPUFA %	38,74 ± 1,06	19,88 ± 3,05	31,26 ± 0,88	34,41 ± 8,83

^cΣPUFA = somma acidi grassi poliinsaturi

Per quanto concerne gli acidi grassi poliinsaturi si osserva una differenza tra i valori riscontrati sia nelle due specie algali, sia tra le microalghe standard (st) e quelle coltivate nel refluo biotrasformato (dep). *Tetraselmis suecica st.* presenta un ΣPUFA pari a 38,74 ± 1,06 dove i PUFA più rappresentati sono C18:2n-6, C18:4n-3, C20:5n-3 e C18:3n-3. Tale valore è il più alto in assoluto sia paragonato a quello registrato in *Tetraselmis suecica dep.* (19,88 ± 3,05), sia paragonato ai valori registrati in *Isochrysis galbana st.* (31,26 ± 0,88) e *dep.* (34,41 ± 8,83). *Tetraselmis suecica* manca di C22:6n-3 come già riportato da altri lavori scientifici (Zhukova e Aizdaicher, 1995; Impiccini *et al.*, 1996; Renauld *et al.*, 1999). I PUFA maggiormente presenti in *Isochrysis galbana* sono C18:2n-6, C18:3n-3, C18:4n-3 e il C22:6n-3.

Tabella XIV. Indici di composizione degli acidi grassi (wt %: dry basis) - medie e range di variabilità - di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel terreno di Walne (st) e nel refluo biotrasformato (dep)

Indici	<i>Tetraselmis suecica st.</i>	<i>Tetraselmis suecica dep.</i>	<i>Isochrysis galbana st.</i>	<i>Isochrysis galbana dep</i>
Σn-3%	33,3 ± 0,47	17,23 ± 3,24	23,60 ± 0,66	23,07 ± 8,97
Σn-6%	5,12 ± 1,51	7,97 ± 5,32	17,33 ± 0,35	26,78 ± 5,58
Σn-3/Σn-6s	6,5	2,83 ± 1,47	1,36	0,94 ± 0,59
SFA/UFA	0,37	0,39 ± 0,05	0,54	0,35 ± 0,08
MUFA/PUFA	0,90	1,71 ± 0,65	0,95	0,96 ± 0,52
ΣFA %	100,99 ± 15,29	81,56 ± 9,58	93,87 ± 3,88	86,50 ± 5,27

Il rapporto saturi/insaturi è inferiore ad 1 in tutti i gruppi algali esaminati. Il rapporto ω3/ω6 risulta particolarmente elevato in *T. suecica st.* (6,5), in quanto risulta l'alga più ricca in acidi grassi poliinsaturi della serie n-3, mentre *Isochrysis galbana* è più ricca in acidi grassi della serie n-6. Le alghe analizzate presentano significative variazioni nel loro valore nutritivo, soprattutto in relazione alla composizione in acidi grassi essenziali.

Le caratteristiche nutrizionali delle microalghe possono essere variamente determinate da fattori genetici e modalità operative, inoltre, come suggerito da Volkman *et al.* (1989), la contaminazione batterica nella coltura algale può influire sul profilo acidico fino al 5%, sviluppandosi significativamente anche se si è partiti da colture di avviamento monoxeniche. I batteri contengono, fra gli altri, acidi grassi C15 e C17 saturi e insaturi e 18:1n-7. Pertanto i relativi valori di questi acidi rappresenterebbero indirettamente un indice della carica microbica nelle colture massive.

Scarsi tenori in 20:5n-3, accompagnati da alti valori in 22:6n-3, sembrano essere una caratteristica di *Isochrysis sp.* (Helm e Laing, 1987; Whyte e Nagata, 1990; Whyte *et al.*, 1994).

3.6.2 Proteine

Il contenuto proteico delle microalghe marine presenta notevoli variazioni intra e inter-specifiche, che risultano strettamente legate all'età della coltura (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). I risultati sono riportati in tabella XVII.

Tabella XVII. Contenuto proteico (% peso secco) medie e range di variabilità riscontrate di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel terreno di Walne (st) e nel refluo biotrasformato (dep)

Specie	Proteine (% peso secco)
<i>Tetraselmis suecica st</i>	26,76 ± 2,97
<i>Tetraselmis suecica dep</i>	17,09 ± 11,60
<i>Isochrysis galbana st.</i>	27,37 ± 1,88
<i>Isochrysis galbana dep</i>	19,52 ± 6,18

Dai dati acquisiti si evince che il contenuto proteico osservato nelle microalghe accresciute sul terreno standard di Walne (*T. suecica st.* = 26,76 ± 2,97; *I. galbana* = 27,37 ± 1,88) non è significativamente differente. I valori ottenuti non si discostano da quelli trovati in letteratura (Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Isochrysis galbana dep. e *Tetraselmis suecica dep.* presentano valori altamente variabili e sempre inferiori ai rispettivi standard (*T. suecica dep.* = 17,09 ± 11,60; *I. galbana dep* = 19,52 ± 6,18) ma molto vicini tra di loro. I bassi valori riscontrati nelle alghe allevate nel refluo biotrasformato sono probabilmente da imputare alla carenza di N del mezzo di coltura utilizzato.

3.6.3 Carboidrati

Il contenuto in carboidrati delle microalghe analizzate è riportato in tabella XVIII.

Tabella XVIII. Contenuto in carboidrati (% peso secco) medie e range di variabilità riscontrate di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel terreno di Walne (st) e nel refluo biotrasformato (dep)

Specie	Carboidrati (% peso secco)
<i>Tetraselmis suecica st</i>	28,59
<i>Tetraselmis suecica dep</i>	31,74 ± 0,2
<i>Isochrysis galbana st.</i>	22,55 ± 2,23
<i>Isochrysis galbana dep</i>	24,83 ± 0,46

Dalla tabella XXI si evince che *T. suecica* st. (**28,59%**) presenta un maggior contenuto in carboidrati rispetto a *I. galbana* st. (**22,55 ± 2,23%**) e che entrambe le alghe coltivate nel refluo biotrasformato hanno un valore del 2-3% superiore ai corrispettivi standard.

I valori in carboidrati ottenuti per *T. suecica* risultano superiori a quelli trovati in letteratura (Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999), mentre per *I. galbana* non si osservano differenze (Brown *et al.*, 1997; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002), nonostante sia stato utilizzato un metodo analitico differente rispetto a quello adoperato in altri lavori di ricerca (Metodo phenolo-ac. solforico – Dubois *et al.*, 1956).

I carboidrati presenti nelle microalghe sono generalmente riserve energetiche intermedie, in quanto risultano utilizzati quando l'azoto nel mezzo di coltura diventa un fattore limitante nella sintesi dei lipidi (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Nello studio effettuato da Valenzuela-Espinoza (2002) è stato visto che quando il contenuto proteico in *I. galbana* diminuiva si osservava un incremento in lipidi e carboidrati.

3.7 Test mitili

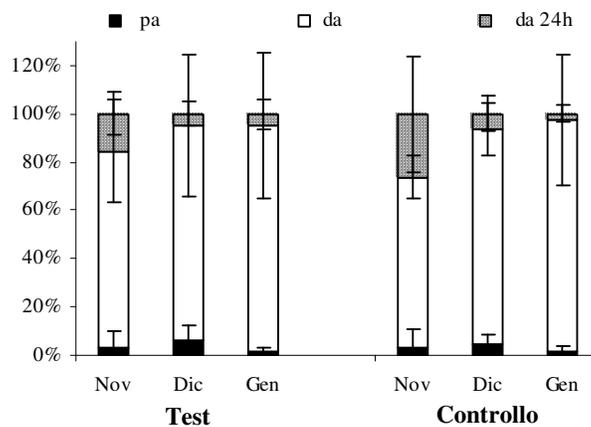
Al fine di valutare il potere nutrizionale delle microalghe marine *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* coltivate nel refluo biotrasformato, ottenuto dalla depurazione dei reflui d'acquacoltura mediante sistema a biodischi, si è effettuato un test di crescita di mitili giovanili della specie *Mytilus galloprovincialis*; in parallelo come controlli sono stati effettuati test di crescita su organismi allevati off-shore (porto di Baia a due diverse profondità – 10 m e 4,5 m) e in-shore (CRIAcq - mediante le stesse microalghe marine ma ottenute mediante sistemi di allevamento standard).

Valutazione dell'assorbimento dell'alimentazione

La valutazione dell'assorbimento dell'alimentazione da parte degli organismi allevati nell'impianto a circuito chiuso è stata effettuata monitorando la concentrazione algale delle microalghe (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*) nell'acqua di allevamento prima della somministrazione dell'alimentazione (**pa** – per accertarsi dell'assenza di tali alghe nell'acqua), nella fase immediatamente successiva alla somministrazione (**da** – per valutare che la concentrazione algale nell'acqua di allevamento sia tale da permettere una buona assimilazione dell'alimento da parte dei semi di *Mytilus galloprovincialis*) e 24 ore

dopo (d24 – per valutare l’assimilazione dell’alimento da parte degli organismi test), prima di cambiare l’acqua di allevamento. Tale stima è stata compiuta sia per gli organismi alimentati con alghe accresciute nei terreni standard, che per i semi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati con microalghe accresciute nel refluo biotrasformato.

Sapendo che la capacità filtrante dei mitili è massima per concentrazioni algali comprese tra 60.000 e 100.000 cell/ml, le microalghe sono state somministrate in modo tale da avere nell’acqua di allevamento tale concentrazione. Dopo la somministrazione dell’alimento è stata quindi valutata la concentrazione algale totale. Il valore medio osservato durante l’intero arco della sperimentazione è stato per il test di 75.400 ± 10.000 cell/ml e per il controllo di 73.270 ± 15.000 cell/ml. Nel grafico 28 è riportata la concentrazione media mensile –in percentuale - di alghe misurata prima della somministrazione dell’alimento, immediatamente dopo, e 24 più tardi sia nel controllo che nel test. In entrambi i casi è possibile osservare come nel tempo aumenti la capacità filtrativa degli organismi probabilmente perchè si adattano sempre meglio alle condizioni di allevamento in impianto. Non si sono registrate grandi differenze di assimilazione da parte dei due gruppi; da qui se ne deduce che le differenze di accrescimento registrate non dipendono da una maggiore o minore quantità di alghe filtrate, ma solamente dal loro contenuto nutritivo.



Graf. 28. Concentrazione media mensile e range di variabilità – espressa in percentuale – della densità algale valutata prima della somministrazione dell’alimento, immediatamente dopo, e 24 ore più tardi sia per il controllo che per il test nelle vaschette di allevamento.

Valutazione dell'accrescimento degli organismi test

Dai risultati ottenuti (grafico 29 - 35) si riscontra un accrescimento sostanziale degli organismi test in ognuno dei 4 gruppi monitorati per tutte le caratteristiche dimensionali in esame (lunghezza, altezza, larghezza, peso vivo, peso valve, peso umido e peso secco frutto).

Nelle tabelle XIX, XX, XXI e XXII sono riportate i valori medi dei diversi parametri dimensionali valutati nei 4 gruppi monitorati e la significatività dei confronti.

Tabella XIX. C2: valore medio \pm range di variabilità ($\bar{x} \pm \sigma$) e significatività (1) dei confronti dei principali parametri dimensionali valutati al tempo t=0g e al tempo t=90g

	t = 0 ($\bar{x} \pm \sigma$)	t = 90g ($\bar{x} \pm \sigma$)
<i>Lunghezza (cm)</i>	3,22 \pm 0,09 a	4,13 \pm 0,21 b
<i>Altezza (mm)</i>	10,45 \pm 0,25 a	14,74 \pm 0,98 b
<i>Larghezza (mm)</i>	17,41 \pm 0,82 a	22,68 \pm 5,93 b
<i>Peso vivo (g)</i>	2,91 \pm 0,36 a	6,01 \pm 1,10 b
<i>Peso umido (g)</i>	0,77 \pm 0,13 a	2,39 \pm 0,34 b
<i>Peso secco frutto (g)</i>	0,12 \pm 0,016 a	0,39 \pm 0,07 b
<i>Peso valve (g)</i>	0,92 \pm 0,10 a	1,88 \pm 0,49 b

(1) lettere diverse indicano significatività per P < 0,05

Tabella XX. C1-4,5: valore medio \pm range di variabilità ($\bar{x} \pm \sigma$) e significatività dei confronti dei principali parametri dimensionali valutati al tempo t=0g e al tempo t=90g

	t = 0 $(\bar{x} \pm \sigma)$	t = 90g $(\bar{x} \pm \sigma)$
<i>Lunghezza (cm)</i>	3,22 \pm 0,09 a	4,0 \pm 0,08 b
<i>Altezza (mm)</i>	10,45 \pm 0,25 a	14,30 \pm 0,66 b
<i>Larghezza (mm)</i>	17,41 \pm 0,82 a	22,67 \pm 0,5 b
<i>Peso vivo (g)</i>	2,91 \pm 0,36 a	4,99 \pm 0,25 b
<i>Peso umido (g)</i>	0,77 \pm 0,13 a	1,38 \pm 0,11 b
<i>Peso secco frutto (g)</i>	0,12 \pm 0,016 a	0,25 \pm 0,08 b
<i>Peso valve (g)</i>	0,92 \pm 0,10 a	1,58 \pm 0,15 b

(1) lettere diverse indicano significatività per P < 0,05

Tabella XXI. C1-10: valore medio \pm range di variabilità ($\bar{x} \pm \sigma$) e significatività dei confronti dei principali parametri dimensionali valutati al tempo t=0g e al tempo t=90g

	t = 0 $(\bar{x} \pm \sigma)$	t = 90g $(\bar{x} \pm \sigma)$
<i>Lunghezza (cm)</i>	3,22 \pm 0,09 a	4,6 \pm 0,15 b
<i>Altezza (mm)</i>	10,45 \pm 0,25 a	16,40 \pm 0,9 b
<i>Larghezza (mm)</i>	17,41 \pm 0,82 a	26,13 \pm 1,19 b
<i>Peso vivo (g)</i>	2,91 \pm 0,36 a	5,95 \pm 1,24 b
<i>Peso umido (g)</i>	0,77 \pm 0,13 a	1,7 \pm 0,29 b
<i>Peso secco frutto (g)</i>	0,12 \pm 0,016 a	0,25 \pm 0,06 b
<i>Peso valve (g)</i>	0,92 \pm 0,10 a	2,19 \pm 0,62 b

(1) lettere diverse indicano significatività per P < 0,05

Tabella XXII. Test: valore medio \pm range di variabilità ($\bar{x} \pm \sigma$) e significatività dei confronti dei principali parametri dimensionali valutati al tempo t=0g e al tempo t=90g

	t = 0 $\bar{x} \pm \sigma$	t = 90g $\bar{x} \pm \sigma$
<i>Lunghezza (cm)</i>	3,22 \pm 0,09 a	3,91 \pm 0,11 b
<i>Altezza (mm)</i>	10,45 \pm 0,25 a	13,93 \pm 0,63 b
<i>Larghezza (mm)</i>	17,41 \pm 0,82 a	20,32 \pm 1,5 b
<i>Peso vivo (g)</i>	2,91 \pm 0,36 a	5,01 \pm 0,53 b
<i>Peso umido (g)</i>	0,77 \pm 0,13 a	1,7 \pm 0,20 b
<i>Peso secco frutto (g)</i>	0,12 \pm 0,016 a	0,26 \pm 0,04 b
<i>Peso valve (g)</i>	0,92 \pm 0,10 a	1,62 \pm 0,27 b

(1) lettere diverse indicano significatività per P < 0,05

Il maggiore accrescimento in lunghezza, larghezza, altezza e peso valve è stato riscontrato nel gruppo di organismi collocati nel porto di Baia a una profondità di 4,5 m (C1-4,5).

Il maggiore accrescimento in peso umido, peso vivo e peso secco è stato registrato negli organismi allevati in impianto mediante l'utilizzo di fitoplancton accresciuto in terreni standard (Walne, Guillard F/2) (C2). Gli organismi alimentati mediante il fitoplancton accresciuto nel refluo biotrasformato dall'impianto a biodischi (Test) presentano un accrescimento sostanziale e in alcuni casi inferiore a quello registrato negli altri gruppi

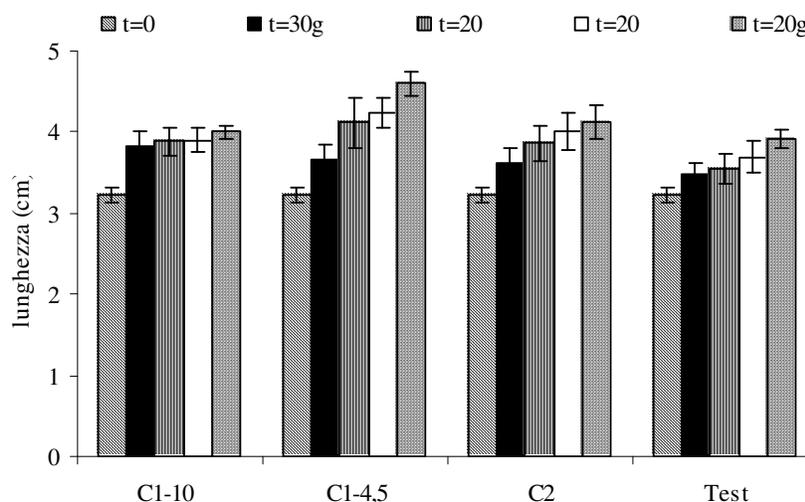


Grafico 29: Andamento dell'incremento della lunghezza (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

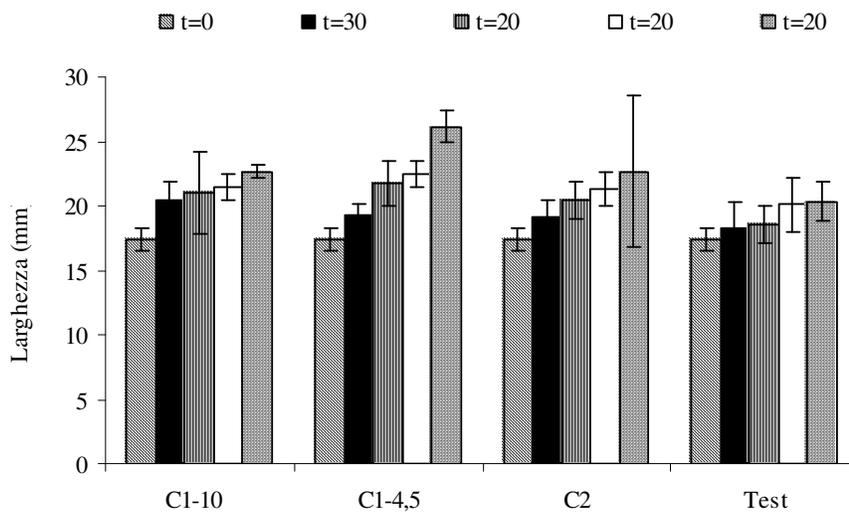


Grafico 30: Andamento dell'incremento della larghezza (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

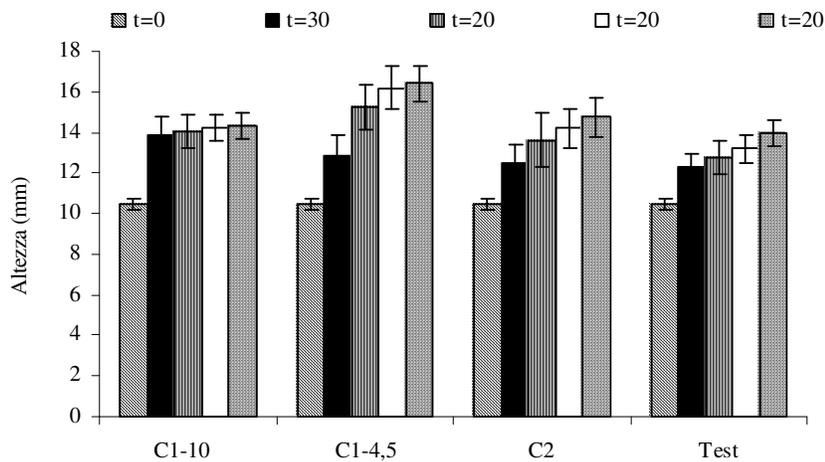


Grafico 31: Andamento dell'incremento della altezza (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

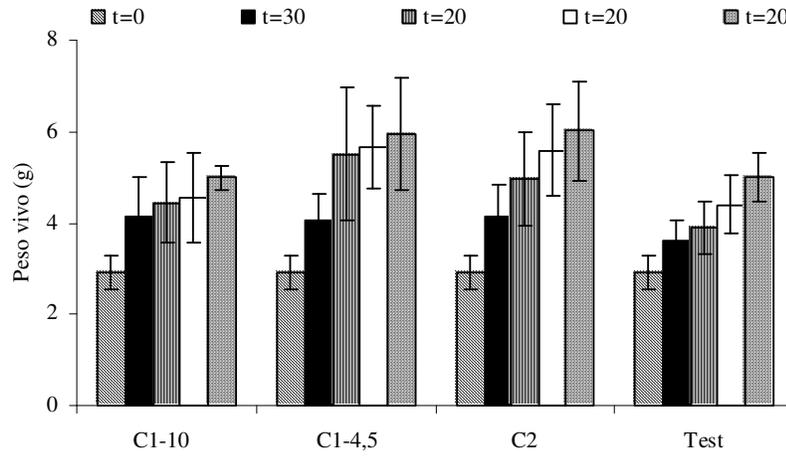


Grafico 32: Andamento dell'incremento del peso vivo (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

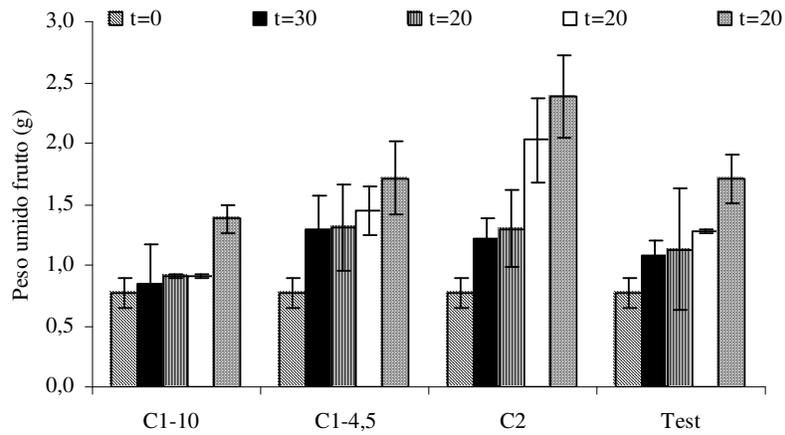


Grafico 33: Andamento dell'incremento del peso umido frutto (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

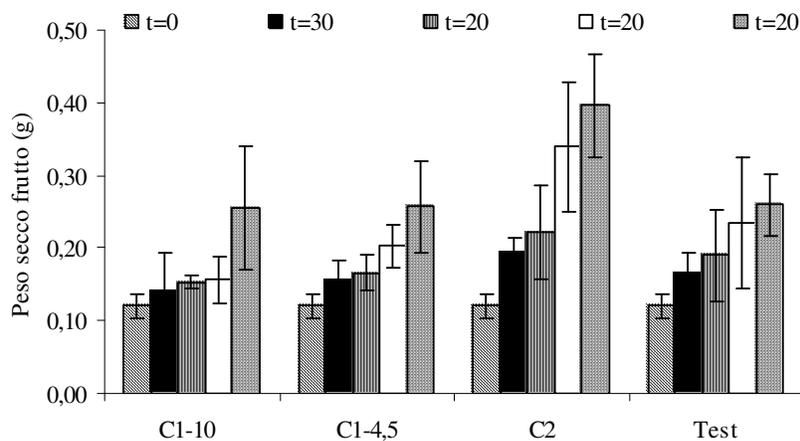


Grafico 34: Andamento dell'incremento del peso secco frutto (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

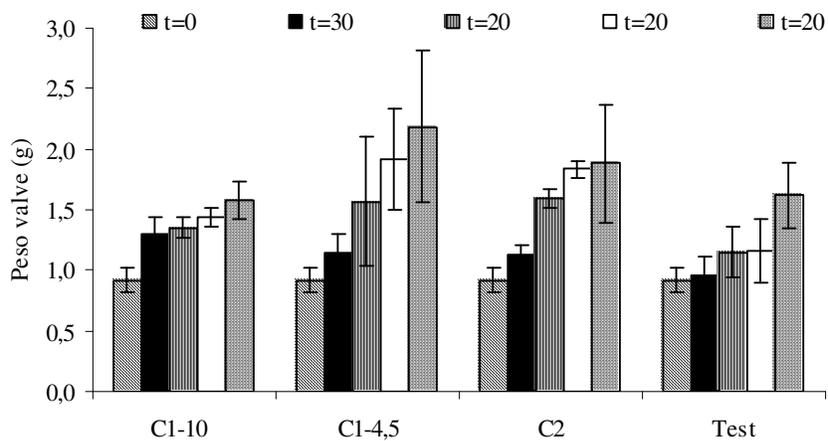


Grafico 35: Andamento dell'incremento del peso valve (media e range di variabilità) osservato nei 4 gruppi di *Mytilus galloprovincialis* alimentati sotto diversi regimi per tre mesi

Per una più corretta valutazione dei dati raccolti, attraverso il peso secco degli organismi è stato valutato il Tasso di Crescita Specifico (TCS%).

Per il TCS% si è riportato graficamente l'andamento durante il periodo di monitoraggio (grafico 36). Dai risultati ottenuti è evidente che il tasso di crescita dei mitili è strettamente legato al sito di allevamento come già osservato in altri lavori scientifici (Camacho *et al.*, 1995).

I maggiori valori del TCS% sono stati registrati nel gruppo di individui stoccato presso il nostro impianto a circuito chiuso dove le condizioni di allevamento altamente stabili e l'alimentazione con microalghe allevate in terreni di allevamento standard hanno permesso un accrescimento regolare del frutto. Interessante è l'andamento del TCS% osservato in tutti e tre i restanti gruppi, dove il TCS% diminuisce nella fase centrale per poi aumentare in quella finale, indicando una fase di accrescimento lento tra due più elevate.

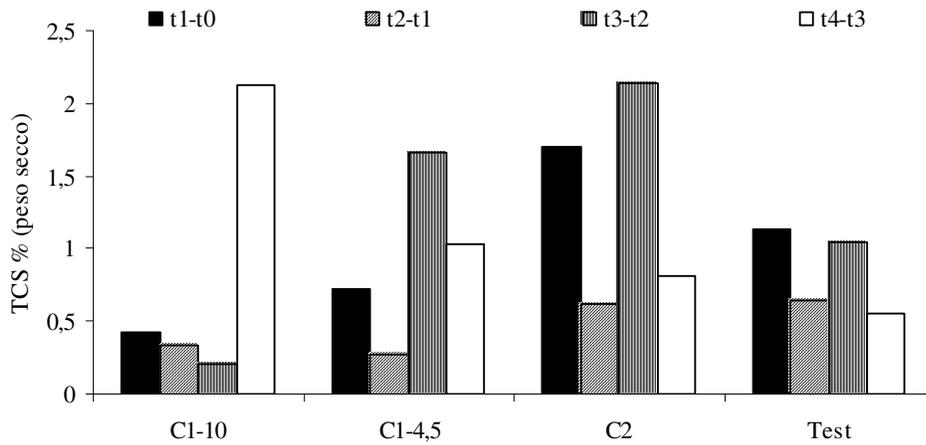


Grafico 36: TCS% misurato per ogni gruppo durante il periodo di monitoraggio

Se si valuta il TCS% finale (grafico 37), si evidenzia che i valori più elevati sono stati registrati per gli organismi controllo e gli individui alimentati mediante il fitoplancton accresciuto nel refluo biotrasformato.

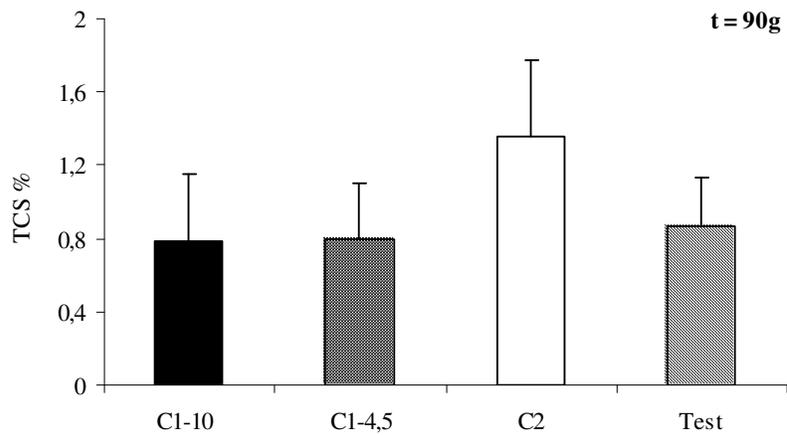


Grafico 37. TCS% finale e range di variabilità valutati per ogni gruppo osservato

Nel presente lavoro si è inoltre proceduto con il valutare l'Indice di Condizione, espresso come rapporto tra il peso secco del frutto (DW) e il peso secco delle valve (VW), in accordo con l'equazione di Freeman (1974). L'Indice di Condizione dei mitili varia in base alla dimensione del corpo (Baird, 1958), alla stagione (Dix and Ferguson, 1984), alla presenza di infestazioni parassitarie (Kent, 1979; Thiesen, 1987) e alle condizioni ambientali, specialmente la disponibilità di cibo e il grado di esposizione all'aria (Baird, 1966; Seed, 1980). Le variazioni stagionali sono dovute a complesse interazioni di fattori ambientali quali temperatura, disponibilità di cibo e salinità, che influenzano la crescita somatica e lo sviluppo riproduttivo. Da ricerche condotte in Linne Mhuirich (Scotland) (Mason, 1976) è emerso che l'Indice di Condizione di *M. edulis* aumenta durante i mesi autunnali e invernali quando la crescita delle valve è virtualmente cessata. Durante la stagione riproduttiva (primavera) si osserva una riduzione di tale indice. Differenze marcate negli indici di condizione possono essere osservate tra mitili accresciuti su fondale sabbioso o in sospensione (su rocce o filari) (Seed e Suchanek, 1992). Tali differenze riflettono la migliore qualità di digestione del cibo e generalmente più basse concentrazioni di sedimento presente nella colonna d'acqua.

I risultati ottenuti sono riportati in grafico 38. Il maggiore CI (21,09%) è registrato nel controllo (C2) alimentato con alghe coltivate su terreno standard (Walne) dopo 90 giorni; i gruppi C1-10 e Test hanno fatto registrare valori di CI molto simili (rispettivamente 16,12% e 16,05%).

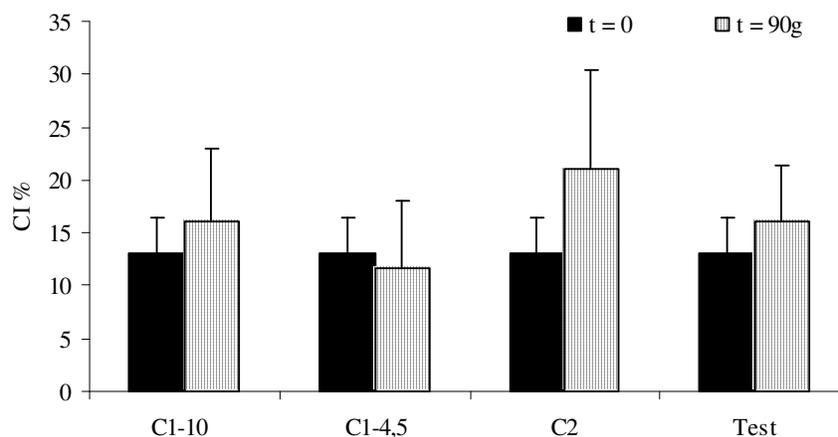
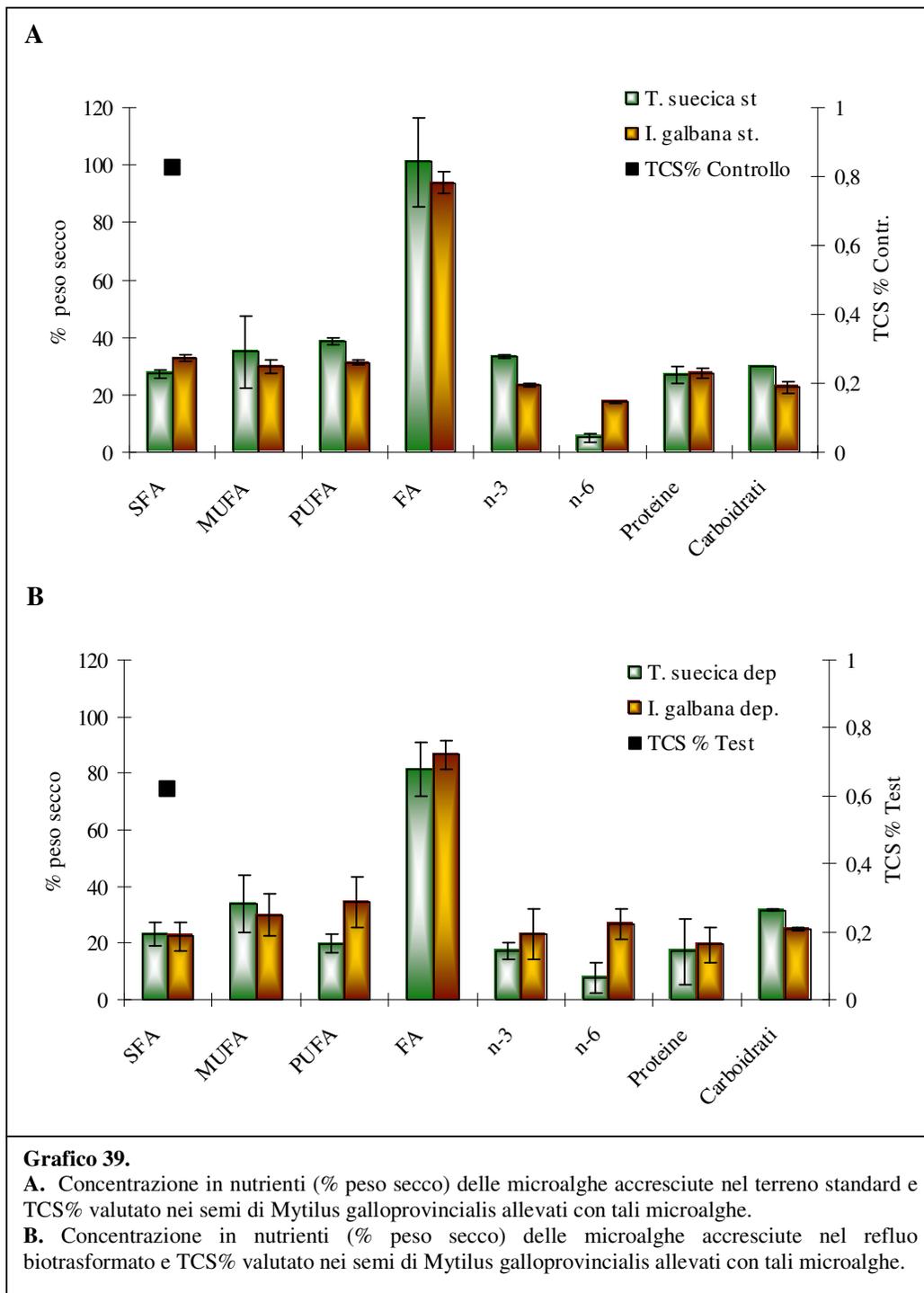


Grafico 38: Indice di Condizione (CI) e range di variabilità valutati nei 4 gruppi testati al tempo t=0 e dopo 90 giorni.

3.8 Contenuto nutritivo delle microalghe e accrescimento dei semi di *Mytilus galloprovincialis*

La presenza e la qualità nutrizionale dell'alimento ha un ruolo importante nell'accrescimento dei bivalvi, in quanto provvede a fornire l'energia necessaria alla crescita. I mitili sono efficienti filtratori, avendo la capacità di filtrare il particolato dalle dimensioni di 2-3 μm con un'efficienza dell'80–100%. E' notoriamente risaputo che i processi bioenergetici dei mammiferi si attuano anche nei bivalvi; infatti glucosio, trigliceridi, acidi grassi liberi e proteine sono utilizzati come fonte energetica. Inoltre è noto che in condizioni di microaerobiosi i carboidrati sono la sola e principale sorgente energetica (Seed e Suchanek, 1992). Nel grafico 39 A e B sono stati riportati i nutrienti valutati nelle due specie algali accresciute nel terreno standard di Walne e nel refluo biotrasformato. Tali valori sono stati confrontati con il tasso di crescita del peso secco dei semi di *Mytilus galloprovincialis* allevati con le microalghe st. e quelle dep.



Le microalghe accresciute nel terreno standard presentano per tutti i nutrienti considerati – eccetto che per gli acidi grassi $\omega 6$ e per i carboidrati – valori più elevati rispetto alle microalghe coltivate nel refluo biotrasformato. Inoltre quest’ultime mostrano una grande variabilità del contenuto nutritivo legato alla variabile composizione del refluo

biotrasformato utilizzato come mezzo di coltura. Se si considerano i TCS% valutati per i due gruppi di mitili – Controllo e Test – si nota una differenza sostanziale che rispecchia le differenze nutrizionali delle microalghe (tabella riassuntiva XXIII).

Tabella XXIII. Riassunto del contenuto nutrizionale delle microalghe coltivate nel terreno standard di Walne e nel refluo biotrasformato

	<i>Tetraselmis suecica st.</i>	<i>Tetraselmis suecica dep.</i>	<i>Isochrysis galbana st.</i>	<i>Isochrysis galbana dep</i>
^c ΣSFA %	27,23 ± 1,56	23,19 ± 4,27	32,77 ± 0,93	22,31 ± 4,82
^c ΣMUFA %	35,02 ± 12,67	33,86 ± 9,92	29,85 ± 2,06	29,79 ± 7,34
^c ΣPUFA %	38,74 ± 1,06	19,88 ± 3,05	31,26 ± 0,88	34,41 ± 8,83
Σn-3%	33,3 ± 0,47	17,23 ± 3,24	23,60 ± 0,66	23,07 ± 8,97
Σn-6%	5,12 ± 1,51	7,97 ± 5,32	17,33 ± 0,35	26,78 ± 5,58
ΣFA %	100,99 ± 15,29	81,56 ± 9,58	93,87 ± 3,88	86,50 ± 5,27
Proteine (% peso secco)	26,76 ± 2,97	17,09 ± 11,60	27,37 ± 1,88	19,52 ± 6,18
Carboidrati (% peso secco)	28,59	31,74 ± 0,2	22,55 ± 2,23	24,83 ± 0,46

Capitolo 4
Conclusioni

4.1 Conclusioni

I dati ottenuti in questo lavoro di ricerca sottolineano la possibilità di recuperare completamente il potere eutrofico dei reflui d'acquacoltura e di attuare un sistema di allevamento integrato in un impianto d'acquacoltura a circuito chiuso.

Le analisi chimiche del refluo prima e dopo il trattamento biologico hanno, infatti, evidenziato un'efficienza media annua di abbattimento per l'ammoniaca del 68,35% e per i nitriti del 70,87%. Tali valori sottolineano il buon funzionamento della biomassa filtrante che si è formata sui biodischi rotanti, e fa prospettare valori ancora più positivi in futuro per lo stabilizzarsi delle popolazioni batteriche desiderate (Nitrosanti e Nitricanti) e l'allontanamento di specie batteriche infestanti. La presenza di *Beggiatoa sp.* (specie microaerofila) è risultata negativa in questo lavoro di ricerca per la sua capacità, a basse concentrazioni di ossigeno, di utilizzare i nitrati come sorgente energetica. I nitrati prodotti dal processo di nitrificazione compiuto dal biofilm sono infatti necessari per l'accrescimento delle microalghe. In realtà, se la presenza di *Beggiatoa* è negativa per l'attuazione di un sistema di allevamento integrato, risulta essere positiva per le sue capacità depurative. La scarsa stabilità delle popolazioni batteriche coinvolte nel processo di nitrificazione è dovuta sia all'elevate variabilità del refluo introdotto nel sistema (diversa provenienza dei reflui e diverse sperimentazioni condotte nell'impianto) che alla scarsa quantità di reflui prodotti dal nostro impianto – di giovane installazione e ancora in una fase di avvio.

Il refluo biotrasformato è stato dunque utilizzato come terreno di coltura di microalghe (*Tetraselmis suecica* e *IsochrYSIS galbana*). Dai risultati ottenuti si è evidenziato che la soluzione biotrasformata è adatta ad essere utilizzata come terreno di coltura algale anche se non permette di raggiungere alte densità cellulari.

Dalla correlazione tra dato chimico e quello biologico è stato evidenziato che la crescita delle microalghe è strettamente legata alle quantità di azoto (fattore limitante la crescita algale nella presente sperimentazione) e non al rapporto N/P in quanto il fosforo è risultato sempre presente a concentrazioni pari o superiori a quelle normalmente introdotte nel terreno di Walne.

Dall'analisi dei nutrienti valutati sul peso secco delle microalghe accresciute nel terreno standard si è osservato che esse presentano per tutti i nutrienti considerati – eccetto che per gli acidi grassi ω6 e per i carboidrati – valori più elevati rispetto alle microalghe coltivate nel refluo biotrasformato. Inoltre quest'ultime mostrano una grande variabilità del contenuto nutritivo legato alla variabile composizione del refluo biotrasformato.

I test di accrescimento di semi di *Mytilus galloprovincialis* hanno sottolineato il potere nutrizionale delle microalghe coltivate nel refluo biotrasformato; se si considera il peso secco del frutto (0,26 ±

0,04 g) ottenuto dopo un periodo di circa 90 giorni esso risulta pari a quello registrato nei due controlli posti nel porto di Baia (a due diverse profondità: 4,5 e 10 m), dove sono collocati numerosi impianti di mitilicoltura. I valori più elevati per il peso secco sono stati registrati nel gruppo di semi alimentati con alghe accresciute in un terreno standard ($0,39 \pm 0,07$ g).

I TCS% valutati per i due gruppi di mitili – Controllo e Test – mostrano una differenza sostanziale che rispecchia le differenze nutrizionali delle microalghe.

In conclusione, i risultati hanno fornito utili indicazioni e, sebbene appaia evidente la necessità di effettuare analisi aggiuntive e continuare la sperimentazione, possiamo affermare che il sistema di allevamento integrato ha dato buoni risultati dimostrando, infatti, come il recupero dei reflui prodotti da un impianto d'acquacoltura mediante un modulo di depurazione a biodischi rotanti possa essere una valida strategia per ridurre l'impatto antropico sull'ambiente.

L'applicazione di tale sistema in impianti d'acquacoltura produttivi permetterebbe un abbassamento dei costi di smaltimento dei reflui, e potrebbe rendere gli impianti capaci di attuare un sistema di allevamento integrato riducendo i costi di approvvigionamento di mangime naturale, utilizzato nel periodo riproduttivo come alimento delle specie ittiche.

Bibliografia

A.P.I. (Associazione Piscicoltori Italiani) (2001). *Quaderno generale dell'acquacoltura italiana*. Ricerca e sviluppo dell'acquacoltura, pp .8-14.

Ackefors, H., Enell, M. (1990). *Discharge of nutrients from Swedish fish farming to adjacent sea areas*. *Ambio* 19, pp. 28-35.

Ahlgren, G., Gustafsson, I.B. and Boberg, M. (1992) *Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae*. *J. Phycol.*, 28, pp. 37-50.

Alonso, D.L, Belardi, E., Rodriguez-Ruiz, J., Segura, C.I. and Gimenez, A. (1998). *Acyl lipids of three microalgae*. In: *Phytochemistry* 47, pp. 1473-1481.

Alonso, L.D., Molina Grima, E., Sanchez Perez, J.A., Garcia Sanchez ,J.L. and Camacho, G. F. (1992). *Isolation of clones of Isochrysis galbana rich in eicosapentaenoic acid*. *Aquaculture*, 102, pp. 363-371.

Alpi, A., Pupillo, P. e Rigano, C. (1992). *Fisiologia delle piante*. II edizione Edises, pp.595.

American Society for Testing and Materials (1982). *Standard Methods for Acidity or Alkalinity of Water*. Publ. D1067-70 (reapproved 1977), American Soc. Testing & Materials, Philadelphia, Pa.

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., (1976). *Inhibition of nitrification of ammonia and nitrous acid*. *J. Water Pollution Control Fed.* 48 (5), pp. 835-852.

Baird, R.H. (1958). *Measurement of condition in mussels and oysters*. *J. Cons.*, 23, pp. 249-257.

Baird, R.H. (1966). *Factors affecting the growth and condition of mussels (Mytilus edulis)*. *Fish. Invest. Minist. Agric. Fish. Food, Lond., Ser II*, 25, pp. 1-33.

Ballestrazzi, R., Lanari, D. and D'Agaro, E. (1995). *Dietary N and P levels, effluent water characteristics and performance in rainbow trout*. *Wat. Sci. Tech*, 31, 10, pp. 157-165.

Ben-Amotz, A., Fishler, R., and Schneller, A. (1987). *Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids*. *Mar. Biol.*, 95, pp. 31-36.

Bower, C. E. and Turner, D. T. (1983). *Nitrification in a closed seawater system*. *Aquaculture* 34, pp. 86-92.

Brown, M.R. and Farmer, C.A. (1994). *Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture*. *J. Appl. Phycol.*, 6, pp. 61-65.

Brown, M.R. and Miller, K.A. (1992). *The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture*. *J. Appl. Phycol.* 4, pp. 205-215.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A. (1997). *Nutritional properties of microalgae for mariculture*. Aquaculture 151, pp. 315-331.

Burrel, B.C., Keller, J. and Blackall, L.L. (1998). *Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor*. Appl. Environ. Microbiol. 64, pp. 1878-1883.

Buschmann, C., Nagel, E., Szabó, K., Kocsányi, L (1994). *Spectrometer for fast measurements of in vivo reflectance, absorptance, and fluorescence in the visible and near-infrared*. Remote Sens. Environ.48; pp.18-24.

Camacho, A. P., Labarta, U. and Beiras, R. (1995). *Growth of mussels (Mytilus edulis galloprovincialis) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability*. Aquaculture 138, pp. 349-362.

Cataudella, S. e Bronzi, P. (2001). *Verso le produzioni acquatiche del terzo millennio*. In: Acquacoltura responsabile. Uniprom, XVIII-686.

Cataudella, S. e Carrada, G.C. (2000). *Introduzione alla conservazione ed alla gestione delle risorse ittiche*. In: Un mare di risorse. Uniprom, 395.

Cohen, I. and Neori, A. (1991). *Ulva lactuca biofilters for marine fishpond effluent. I. Ammonia uptake kinetics and nitrogen content*. Botanica Marina 34, 475–482.

Daims, H., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Juretschko, S. and Wagner, M. (2000). *Novel Nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology*. Water Sci. Technol. 41, pp. 85-90.

Danovaro, R. (2001). *Recupero ambientale*. Tecnologia, bioremediation e biotecnologie. Utet , 580.

Diab, S. and Shilo, M. (1988). *Effect of light on the activity and survival of Nitrosomonas sp. and Nitrobacter sp. isolates from fish ponds*. Isr. J. Aquaculture Bamidgeh 40 (2), pp. 50–56.

Dix, T.G. and Ferguson, A. (1984). *Cycles of reproduction and condition in Tasmanian blue mussels Mytilus edulis planulatus*. Aust. J. Mar. Freshw. Res., 35, pp. 307-313.

Fantei, I, Strumia, F. e Soprani (1992). *Microbiologia e depurazione. La microbiologia al servizio del gestore degli impianti di depurazione aerobici*.

FAO (1995). *Code of Conduct for Responsible Fisheries*. Roma, FAO, pp.48.

FAO Fisheries Department (1997). *Inland fisheries. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*. N 6, Rome, FAO, pp 36.

Fernandez-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.j. and Labarta, U. (1989). *Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae*. Aquaculture, 83, pp.17-37.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations** (1999). *Hatchery Production Procedures*. In: Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, vol. 1.
- Freeman, K.R.** (1974). *Growth, mortality and seasonal cycle of Mytilus edulis in two Nova Scotian embayments*. Department of the Environment. Fisheries and Marine Service, Canada, Technical Report n° 500, pp. 112.
- G.U.** supplemento n.4 al n.86 del 10.08.1994. *Determinazioni delle sostanze azotate nei cereali e derivati*.
- Galasso, M.** (1982)- *Indagine sul fiume Sabato*. In *Inquinamento*:pp. 66-98 Ghetti, P.F.
- Gazzetta ufficiale** (1992). *Metodi ufficiali*. Direttiva 92/69/CEE della Commissione, del 31 luglio 1992, recante diciassettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio. N. L 383 del 29/12/1992 pag. 0113 – 0115.
- Gibbs, M.** and Schiff, J.A. (1960). Chemosynthesis: *The energy relations of chemoautotrophic organisms*. In: Steward, F.C. (Ed.), *Plant Physiology: A Treatise*, Vol. IB: photosynthesis and chemosynthesis. New York, pp. 279–319.
- Gordin, H.** (1983). *Advances in marine aquaculture in the Red Sea*. Bull. Inst. Oceanogr. Fish. 9, pp.436-432.
- Hagopian, D.S.,** Riley, J.G., (1998). *A closer look at the bacteriology of nitrification*. *Aquacultural Eng.* 18, 223–224.
- Hall, P.O.J.,** Holby, O., Kollberg, S. and Samuelsson, M.O. (1992). *Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. IV. Nitrogen*. *Mar: Ecol. Prog. Ser.* 89, pp 81-91.
- Hammond, O.,** Gaber, A. and Abdel-Raouf, N. (1995). *Microalgae and Wastewater Treatment*. *Ecotoxicology and Environmental safety* 31, pp. 250-210.
- Hammouda, H.E.** (1994). *Inhibition of ammonium and nitrate uptake by trichlorfon in Gloeocapsa sp.* *Mans. Sci. Bull. (B. Biology)*. 21, 1, pp. 87-80.
- Helm, M.M.** and Laing, I. (1981). *Cost effective culture of marine unicellular algae*. *Energy Conservation and Use of Renewable Energies in the Bio-industries*. Ed.: F. Vogt, pp. 247-259.
- Helm, M.M.** (1990). *Culture of microalgae*. In: *Tapes philippinarum*. *Biologia e sperimentazione*. E.S.A.V. pp 91-105.
- Helm, M.M.** and Laing, I. (1987). *Preliminary observations on the nutritional value of "Tahiti Isochrysis" to bivalve larvae*. *Aquaculture* 62, pp:281-288.
- Hovanec, T.A.** and DeLong, E.F. (1996). *Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, pp. 1444-1450.

Impiccini, R., Rossi, R., Melotti, P. (1996). *Acidi grassi e contenuto lipidico di ceppi algali.* Laguna 4.

James, C.M., Al-Hinty, S. and Salman, A.E. (1989). *Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes.* Aquaculture, 77, pp. 337-357.

Jerome, H., Lefebvre, S., Brossard, N. (1998). *Open-air treatment of wastewater from land-based marine fish farms in extensive and intensive systems: current technology and future perspectives.* Aquat. Living Resour. 11 (4); pp 297-304.

Johnstone, B.H., Jones, R.D. (1988). *Effects of light and CO on the survival of a marine ammonium-oxidizing bacterium during energy source deprivation.* Appl. Env. Microbiol. 54 (12), pp. 2890–2893.

Jones, G.L., Paskins, A.R., (1982). *Influence of high partial pressure of carbon dioxide and/or oxygen on nitrification.* J. Chem. Tech. Biotechnol. 32, pp. 213–223.

Kanazava, A., Teshima and Kazuo, O. (1979). *Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids.* Comp. Biochem. Physiol., 63B, pp. 295-298.

Kanazawa, A. (1985) *Essential fatty acid requirement..* In: Cowey C.B., Mackie A.M. & Bell J.G. (eds). Nutrition and Feeding in Fish. Academic, Inc. London, pp. 281-298.

Kent, R.M.L. (1979). *The influence of heavy infestation of Polydora ciliata on the flesh content of Mytilus edulis.* J. Mar. Biol. Ass. U.K., 59, pp. 289-297.

Krom, N. D. and Neori, A. (1989). *A total nutrient budget for an experimental fishpond with circularly moving seawater.* Aquaculture 83, pp 345-358.

Kumar, S., Nicholas, D.J.D., (1983). *Proton electrochemical gradients in washed cells of Nitrosomonas europaea and Nitrobacter agilis.* J. Bacteriol. 154 (1), pp. 65–71.

Langdon, C. and Önal, E. (1999). *Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussels Mytilus galloprovincialis.* Aquaculture 180, pp 283-294.

Langdon, C.J. and Waldock, M.J. (1981). *The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acids composition of Crassostrea gigas spat.* J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 61, pp. 431-448.

Lehninger, AL (1999) *Principi di biochimica, Zanichelli, u.e..*

Lomas, M.W. and Glibert, P.M. (1999) *Interactions between NH₄ and NO₃ uptake and assimilation: comparison of diatoms and dinoflagellates at several growth temperatures.* Mar. Biol., 133, pp. 541-551.

Mason, J. (1976). *Cultivation.* In: B.L. Bayne (ed), Marine Mussels: their ecology and physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 385-410.

Masotti, L. (1987). *Depurazione delle acque: tecniche ed impianti per il trattamento delle acque di rifiuto*. Calderini, 1145.

Meybeck, M., Friedrich, G., Thomas, R. and Chapman, D. (1996). *RIVERS*. Water quality assessments (Ed. D. Chapman), pp 243-318.

Miraaf (1997). V Piano triennale della pesca e dell'acquacoltura. Ministero delle risorse agricole, alimentari e forestali, Roma.

Mohan, J.M. (ed.) (1990). *Aquaculture in Asia*. Asian Fisheries Society, Indian Branch, Mangalore, pp. 396.

Montaini, E., Chini Zittelli, G., Tredici, M.R., Molina Grima, E., Fernandez Sevilla, J.M., Sanchez Perez, J.A. (1995). *Long-term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile*. In: *Aquaculture* 134, pp. 81-90.

Munday, B., Eleftheriou, A., Kentouri, M. and Divanach, P. (1992). *The interactions of aquaculture and the environment – A bibliographical review*. Commission of the European Communities – Directorate – General for Fisheries, 184.

Navarro, E., Iglesias, J.I.P., Camacho A.P. and Labarta, U. (1996). *The effect of diets of phytoplankton and suspended bottom material on feeding and absorption of raft mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk)*. *J. of Experimental Marine Biology and Ecology* 198, pp. 175-189.

Negroni, G. (1997). *L'allevamento in gabbie del pesce, una valida alternativa tecnica a quello a terra*. *Il Pesce* n 2/97, pp.12-16.

Neori, A., Coehn, I. and Gordin, H. (1991). *Ulva lactuca biofilters for marine fishpond effluents II. Growth rate, yield and C : N ratio*. *Botanica Marina* 34, pp. 483-489.

Neori, A., Krom, M.D., Ellner S.P., Boyd, C.E., Popper, D., Rabinovitch, R., Davison, P. J., Dvir, O., Zuber, D., Ucko, M., Angel, D. and Gordin, H. (1996). *Seaweed biofilters as regulators of water quality in integrated fish-seaweed culture units*. *Aquaculture* 141, pp. 183-199.

Neori, A., S.P. Ellner, C.E. Boyd and M.D. Krom. (1993). *The integration of seaweed biofilters with intensive fish ponds to improve water quality and recapture nutrients*. In *G.A. Moshiri*. *Constructed Wetlands for Water Quality Improvement*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 603-607.

Otero, A., Fabregas, J. (1997). *Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates*. *Aquaculture*, 159, pp. 111-123.

Painter, H.A. (1970). *A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms*. *Water Res.* 4, 393–450.

Parrish, C.C. and Wangersky, P.J. (1990). *Growth and lipid class composition of the marine diatom, Chaetoceros gracilis, in laboratory and mass culture turbidostats*. J. of Plank. Res., 12(5), pp. 1011-1021.

Penczak, T., Galickan, W., Molinsky, M., Kusto E. and Zalewsky, M. (1982). *The enrichment of a mesotrophic lake by carbon, phosphorus, and nitrogen from the cage aquaculture of rainbow trout, Salmo gairdneri*. J. Appl. Ecol, pp. 371-393.

Piccioli A. (2001). *Le produzioni in Europa*. In: Acquacoltura Responsabile. A cura di Cataudella S.e Bronzi P. Unimar-Uniprom, 22-30.

Pillay, T.V.R. (1992). *Aquaculture and environment*. Cambridge, MA Fishing News Books, pp.191.

Porter, C.P., Krom, M.D., Robbins, M.G., Brickell, L. and Davidson, A. (1987). *Ammonia excretion and total N budget for gilthead seabream (Sparus aurata) and its effect on water quality conditions*. Aquaculture 66, pp. 287-298.

Prosky, L. Asp, Furda, N.G., De Vries, I., Schweizer, and Harland, J.W. (1985). *Determination of Total Dietary Fiber in Foods Products: Collaborative Study*. J. Assoc. Anal. Chem., 8 (4), pp. 677-679.

Ramadori, R. e Tandoi, V. (2003). *Depurazione biologica delle acque di scarico*. In: Ecologia applicata. CittàStudiEdizioni. A cura di Provini, Galassi e Marchetti; pp 369-404.

Ravagnan, G. (1995). *Manuale di acquacoltura costiera*. CEAC-progetto Stride, Venezia, pp.415.

Reay, P.J. (1988). *Quaderni di biologia pura ed applicata: Acquacoltura*. Edagricole, IX-92.

Renaud, M.S., Thinh, L. and Parry, D.L. (1999). *The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture*. Aquaculture 170, pp. 147-159.

Renaud, M.S., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. (2002). *Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures*. Aquaculture 211, pp.195-214.

Ryther, J.H., Goldman, J.C., Gifford, J.E., Huguenin, J.E., Wing, A.S., Clarner, J.P., Williams, L.D. and Lapointe, B.E. (1975). *Physical models of integrated waste recycling marine polyculture systems*. Aquaculture 5, pp163-177.

Sakairi, C.A.M., Yasuda, K. and Matsumura, M. (1996). *Nitrogen removal in seawater using nitrifying bacteria immobilized in porous cellulose carrier*. Wat. Sci. Tech. 34, 7-8, pp. 267-274.

Sargent, J., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. (1989) *The Lipids*. In: Halver J.E. (ed.). Fish Nutrition. (2th ed.) Academic Press, Inc. London. pp. 798.

Saroglia, M. (2001). *Sistemi a ricircolazione idrica*. In: Acquacoltura Responsabile. A cura di Cautadella S., e Bronzi P. Ed. Unimar-Uniprom. pp. 352-374.

Sbrilli, G. (2000) *Test alghe* (Raphidocelis subcapitata, Dunaliella tertiolecta), ARPA Toscana, Corso di Ecotossicologia applicata, Milano, 19-20 ottobre.

Sbrilli, G., Liberti, A., Caldini, G., Corsini, A. (1998). *Metodologia di saggio algale per il controllo di corpi idrici e delle acque di scarico*. ARPAT, pp. 121.

Seed, R. (1980). *Shell growth and form in the Bivalvia*. In: D.C. Rhoads and R.A. Lutz (editors), Skeletal Growth of Aquatic Organism, pp. 23-67.

Seed, R. and Suchanek (1992). *Population and community ecology of Mytilus*. In: The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture. Gosling (ed.). Developments in aquaculture and fisheries science, vol 25, pp. 87- 169.

Shpigel, M., Neori, A., Marshall, A., Lupatsch, I., (1996). *Propagation of the abalone Haliotis tuberculata in land-based system in Eilat Israel*. Journal of the World Aquaculture Society, 27, pp. 435-442.

Shpigel, M., Neori, A., Popper, D. M., Gordin, H. 1993. *A proposed model for "environmentally clean" land-based culture of fish, bivalves and seaweeds*. Aquaculture **117**, pp. 115–28.

Skjølstrup, J., Nielsen, P.H., Frier, J.O., McLean, E. (1998). *Performance characteristics of fluidised bed biofilters in a novel laboratory-scale recirculation system for rainbow trout: nitrification rates, oxygen consumption and sludge collection*. Aquacultural engineering 18 pp. 265-276.

Smith, Z., Mccaig, A.E., Stephen, J.R., Embley, T. M. and Prosser, J.I. (2001). *Species diversity of uncultured and cultured population of soil and marine ammonia oxidizing bacteria*. Microb. Ecol. 42, pp. 228-237.

Summerfelt, S. T. and Sharrer, M. J. (2004). *Design implication of carbon dioxide production within biofilters contained in recirculating salmonid culture systems*. Aquacultural Engineering 32, pp. 171–182.

Suzuki, L., Dular, U., Kwok, S.C., (1974). *Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by Nitrosomonas europaea cells and extracts*. J. Bacteriol. 120, pp. 556–558.

Tal, Y., Watts, J. E. M., Schreier, S. B., Sowers, K. R. and Schreier, H.J. (2003). *Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated*

with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture* 215, pp.187-202.

Tancioni, L e Scardi, M. (2001). *Ecologia in acquacoltura*. In Cataudella, S. e Bronzi, P., *Acquacoltura Responsabile*. Roma Uniprom, pp.154-173,.

Theisen, B.F. (1987). *Infestation of Mytilus edulis by Mytilicola intestinalis*. *Ophelia*, 27, pp. 77-86.

Tillmann, U. and Rick H.J. (2001). *Synthesis and New Conception of North Sea Research (SYCON)*. *Berichte aus dem Zentrum für Meeres- und Klimaforschung n. 9*, pp 113.

Tsuzuki, M., Ohnuma, E., Sato, N., Takaku, T. and Kawaguchi, A. (1990) *Effects of CO2 concentration during growth on fatty acid composition in microalgae*. *Plant Physiol.*, 93, pp. 851-856.

Valenzuela-Espinoza, E., Millan-Nunez, R., Nunez-Cebrero, F. (2002). *Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in Isochrysis aff. galbana (clone T-iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium*. *Aquacultural Engineering* 25, pp: 207-216.

Van Rijn, J. (1996). *The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture*. *Aquaculture* 139, pp. 181-201.

Vandermeulen, H, Gordin, H (1990). *Ammonium uptake using Ulva (Chlorophyta) in intensive fishpond systems: mass culture and treatment of effluent*. *J. Appl. Phycol.* 2, pp. 363–374.

Walne, P.R. (1974). *Culture of Bivalve Molluscs. 50 Years's Experience at Conway*. Fishing News (Books), West Byfleet, pp. 173.

Watanabe, T., Kitajima, C. and Fujita. (1983). *Nutritional values of live organisms used in Japan for the mass propagation of fish: a review*. *Aquaculture* 34, pp. 115-143.

Wesley Eckenfelder, W. Jr. (1993). *Tecnologie di trattamento dei reflui industriali*. *Etaslibri*, 427.

Wheaton, F., J. Hochheimer, G.E. Kaiser, (1991). *Fixed-film nitrification filters for aquaculture*. In: D.E. Brune, J.R. Tomasso (Eds.), *Aquaculture and Water Quality*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 272–303.

Whyte, J. N.C. and Nagata, W.D. (1990). *Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, Brachionus plicatilis, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton*. *Aquaculture*, 89, pp: 263-272.

Whyte, J.N.C., Clarke, W.C., Gingher, N.G., Jensen, J.O.T. and Townsend L.D. (1994). *Influence of composition of Brachionus plicatilis and Artemia on growth of larval sablefish (Anoplopoma fimbria Pallas)*. *Aquaculture*, 119, pp.47-61.

Whyte, N.C.J. (1987). *Biochemical Composition and Energy Content of six Species of Phytoplankton used in Mariculture of Bivalves*. *Aquaculture* 60, pp. 231-241.

Yang, P. Y., Nitorisavaut, S. and Wu, J. S. (1995). *Nitrate removal using a mixed culture entrapped microbial cell immobilization process under high salt conditions*. *Wat. Res.*, 29, pp. 1525-153.

Zhukova, N.V. and Aizdaicher, N.A. (1995). *Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae*. *Phytochemistry* 39, pp: 351-356.

SITI INTERNET CONSULTATI:

- ✚ www.acquacoltura.it (API – Associazione Piscicoltori Italiani);
- ✚ www.fao.org (Organizzazione delle nazioni Unite per l’Alimentazione e l’Agricoltura);
- ✚ FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation). Fisheries Department. Database and Statistics: <http://www.fao.org/fi/statist/statist.aspa>
- ✚ www.federco pesca.it (Federco pesca);
- ✚ www.federpesca.it (Federpesca);
- ✚ www.irepa.org. (Istituto Ricerche ed Informazioni sui mercati Agricoli);
- ✚ www.ismea.it (Istituto Nazionale di Statistica);
- ✚ www.istat.it (Istituto Nazionale di Statistica);
- ✚ www.legapesca.ir (Associazione Nazionale delle Cooperative della Pesca);
- ✚ www.politicheagricole.it (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali);
- ✚ Basurco, B. e Lovatelli, A. (2003).The Acquaculture Situation in the Mediterranean sea Prediction for the Future. www.iasonnet.gr/abstracts/Basurco.pdf;
- ✚ www.acquaguide.com
- ✚ www.icram.com
- ✚ www.pubit.it
- ✚ www.regione.emilia-romagna.it
- ✚ www.unimondo.org
- ✚ www.lexambiente.com
- ✚ www.acqueinterne.it
- ✚ www.globeitalia.it
- ✚ www.ica-net.it