

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



FACOLTÀ DI AGRARIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI

INDIRIZZO ACQUACOLTURA

XXI CICLO

***OTTIMIZZAZIONE DI COLTURE FITOPLANCTONICHE***

***INTENSIVE PER APPLICAZIONI PRODUTTIVE ECOSOSTENIBILI***

***ED ECOCOMPATIBILI***

Coordinatore  
Chiar.mo Prof.  
Giancarlo Barbieri

Dottorando  
Dott. Pier Antimo Carlino

Relatore  
Chiar.mo Prof.  
Giovanni Sansone

<b>CAPITOLO 1</b>	<b>5</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
1.1 Acquacoltura ecosostenibile ed ecocompatibile	5
1.2 Acquacoltura intensiva da una prospettiva ecologica	11
1.3 Impatto ambientale dell'acquacoltura intensiva	13
1.4 I reflui	16
1.5 Il Trattamento dei reflui	18
1.6 Il rapporto tra Acquacoltura Intensiva, Qualità ed Ecosostenibilità-Ecocompatibilità	21
1.7 Innovazione di processo	21
1.8 Innovazione di prodotto	22
1.9 Caso studio: larvicoltura di rombo chiodato ( <i>Psetta maxima</i> ) allevato in mesocosmo	23
1.9.1 Produzione di uova	23
1.9.2 Coltura larvale	24
1.9.3 Sviluppo larvale	25
1.9.4 Alimentazione larvale	26
1.9.5 Rotiferi	26
<b>CAPITOLO 2</b>	<b>30</b>
<b>2 STATO DELL'ARTE</b>	<b>30</b>
2.1 Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili	30
2.1.1 Importanza e ruolo delle fitocolture nell'acquacoltura responsabile	30
2.1.2 Le produzioni fitoplanctoniche nei sistemi intensivi a circuito chiuso	32
2.1.2.1 Criteri di selezione dei ceppi algali	32
2.1.2.2 Le differenti destinazioni delle microalghe utilizzate come 'mangime vivo' in acquacoltura	33
2.1.3 Trattamento di sterilizzazione	35
2.2 La missione del CRIAcq	43
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>46</b>

<b>3.1</b>	<b>Scopo della ricerca</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Piano sperimentale</b>	<b>46</b>
<b>CAPITOLO 4</b>		<b>48</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>48</b>
<b>4.1</b>	<b>Gestione Fitocolture</b>	<b>48</b>
4.1.1	Obbiettivo e risultati nella gestione di una coltura	48
4.1.2	Coltura algale: un piccolo ecosistema	48
4.1.3	Biotecnologia delle colture algali massive	48
4.1.4	Allevamento a lotti e in semi-continuo	49
4.1.5	Il ciclo algale	50
4.1.6	Operazioni del processo di coltura algale	51
4.1.7	Parametri fondamentali delle colture algali	52
<b>4.2</b>	<b>Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili</b>	<b>54</b>
4.2.1	Specie algali allevate	54
4.2.2	Terreno di coltura utilizzato	55
4.2.3	Calcolo e modifica della salinità	56
4.2.4	Sterilizzazione tramite U.V.	57
4.2.5	Sterilizzazione chimica dell'acqua	57
4.2.6	Sterilizzazione attrezzatura	57
4.2.7	Conta batterica	58
4.2.8	Procedura per effettuare gli inoculi in sterilità	58
4.2.9	Conta cellulare con emocitometro 'manuale' (camera di Bürker)	59
4.2.10	Conservazione dei ceppi algali	60
4.2.11	Colture starter delle tre specie	61
4.2.12	(a) Colture intermedie delle tre specie	61
4.2.12	(b) Colture intermedie delle tre specie	62
4.2.13	Colture in bocce di vetro	63
4.2.14	Analisi statistica	63
<b>4.3</b>	<b>Caso studio: larvicoltura di rombo chiodato (<i>Psetta maxima</i>) allevato in mesocosmo</b>	<b>64</b>
4.3.1	Condizioni sperimentali	64
4.3.2	Monitoraggio dei parametri di schiusa	64
4.3.3	Allestimento dei mesocosmi	67
4.3.4	Il sistema a ricircolo	68
4.3.4.1	Il filtro meccanico	68

4.3.4.2	La depurazione biologica	69
4.3.5	Il protocollo alimentare adottato	70
<b>4.4</b>	<b>L'impianto pilota a circuito chiuso</b>	<b>70</b>
 <b>CAPITOLO 5</b>		 <b>73</b>
<b>5</b>	<b>ANALISI DEI RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>73</b>
<b>5.1</b>	<b>Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili</b>	<b>73</b>
5.1.1	Organizzazione e gestione delle acque ricicchanti: gestione delle acque a "pacchetti" (quantità definite di acqua ricicclata differentemente trattata e stoccata per le differenti necessità del programma produttivo)	73
5.1.2	Trattamento meccanico-biologico delle acque del sistema a circuito chiuso e valutazione dei parametri chimici-fisici del refluo	74
5.1.3	Colture algali per le finalità produttive prescelte in sistema a circuito chiuso. Ottimizzazione delle colture fitoplanctoniche in piccoli e medi volumi	75
5.1.3.1	Crescita di <i>T. suecica</i> : effetto dei metodi di sterilizzazione selezionati	77
5.1.3.1	T1 Analisi delle differenze tra le concentrazioni per singoli volumi	77
5.1.3.1	T2 Curva totale di crescita di <i>Tetraselmis suecica</i>	79
5.1.3.2	Crescita di <i>Isochrysis galbana</i> : effetto dei metodi di sterilizzazione selezionati	80
5.1.3.2	I1 Analisi delle differenze tra le concentrazioni tra singoli volumi	80
5.1.3.2	I2 Curva totale di crescita di <i>Isochrysis galbana</i>	82
5.1.3.3	Crescita di <i>Nannochloropsis oculata</i> : effetto dei metodi di sterilizzazione selezionati	83
5.1.3.3	N1 Analisi delle differenze tra le concentrazioni tra singoli volumi	83
5.1.3.3	N2 Curva totale di crescita di <i>Nannochloropsis oculata</i>	85
5.1.4	Ottimizzazione protocolli di sterilizzazione per i grandi volumi e valutazione dei parametri microbiologici	86
<b>5.2</b>	<b>Caso studio: larvicoltura di rombo chiodato (<i>Psetta maxima</i>) allevato in mesocosmo</b>	<b>90</b>
 <b>CAPITOLO 6</b>		 <b>94</b>
<b>CONCLUSIONI</b>		<b>94</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>		<b>95</b>
<b>ALLEGATO FIGURE E TABELLE</b>		<b>100</b>

## Capitolo 1

### 1 Introduzione

#### 1.1 Acquacoltura ecosostenibile ed ecocompatibile

L'estremizzazione della visione centralistica del mondo, secondo cui l'uomo è misura di tutte le cose, ha portato negli ultimi decenni a considerare la natura, intesa nel suo insieme di sistemi biologici, come assolutamente dipendente dall'uomo e pertanto perfettamente adattabile alle sue esigenze. Tale gestione del patrimonio naturale ha condotto spesso a scelte sconosciute che hanno tenuto conto solo del profitto del momento senza badare ai possibili risvolti futuri e senza tener conto della sostenibilità ambientale di tali scelte (Matassino, 2001).

L'espressione *sviluppo sostenibile* compare per la prima volta nel 1987 in un documento delle Nazioni Unite, noto come *Rapporto Brundtland*. L'avvenire dell'umanità potrà essere garantito solo a patto che si realizzi su scala mondiale *uno sviluppo capace di soddisfare i bisogni materiali e spirituali dell'attuale generazione senza compromettere i diritti delle generazioni future*, alle quali va garantito lo stesso capitale di risorse naturali oggi esistente. Il parametro della sostenibilità comporta una duplice prospettiva: intanto che si tenga conto dei costi economici non solo locali ma globali, non solo immediati ma anche futuri; in secondo luogo che si consideri lo sviluppo non più esclusivamente come crescita economica quantitativa, bensì anche e soprattutto processo qualitativo, ossia in termini di costi ambientali e umani.

Nell'ultimo quindicennio lo sviluppo dei processi di *globalizzazione* dell'economia del pianeta terra ha modificato e sta modificando ancora notevolmente le relazioni fra i sistemi produttivi e le basi della competitività. Diventa allora di fondamentale importanza l'osservanza di alcuni principi di fondo:

- ✓ rispetto della *capacità ricettiva* dell'ambiente;
- ✓ evitare *l'esaurimento delle risorse* minerarie ed energetiche non rinnovabili;
- ✓ consentire lo sviluppo dei paesi del Terzo Mondo, garantendo loro di accedere a una porzione delle risorse esauribili e non rinnovabili corrispondente alla propria popolazione (*principio di equità*).

Alla base di ogni strategia per limitare gli effetti e la portata dell'inquinamento ambientale nella prospettiva di uno sviluppo sostenibile sta l'adozione di tecnologie produttive *pulite* che consentano di impiegare, nel modo più razionale ed economico possibile, le risorse (materie prime ed energia) minimizzando la quantità di rifiuti e residui (gassosi, liquidi e solidi) connessi alla fabbricazione e all'uso dei prodotti.

Il rispetto dell'ambiente richiederà sempre più attenzione, pur nell'ottica dell'incremento delle produzioni per soddisfare le esigenze in nutrienti di una popolazione che, non solo aumenta numericamente, ma intende migliorare continuamente la qualità nutrizionale del cibo.

Nel mondo industrializzato il concetto di *risorsa* è identificato con quello di qualcosa da sfruttare, mentre sarà necessario considerarla come un bene da tutelare, da conservare e da utilizzare con oculata programmatoria. Il settore agro-alimentare può costituire un esempio pilota per il miglioramento e per la salvaguardia dell'ambiente. Indubbiamente, il bisogno di ridurre l'inquinamento sarà la matrice dell'invenzione e della ricerca di nuove soluzioni. La politica ambientale deve essere non l'arte del possibile ma l'arte di rendere attuabile ciò che è necessario (Matassino e Cappuccio, 1998).

E' facile prevedere che il benessere dell'uomo sarà fortemente dipendente da una produzione di alimenti dalle caratteristiche nutrizionali sempre più rispondenti a soddisfare le variegate esigenze della persona umana considerata nel suo 'status' fisiologico peculiare ma dinamico temporalmente e spazialmente.

La parola agricoltura può dunque essere sostituita dal termine *agroecosistema* per tutte le implicazioni che la più antica attività produttiva dell'uomo ha nel contesto di qualsiasi ecosistema (Matassino, 1997).

L'agroecosistema potrà essere, nel medio-lungo periodo, uno dei maggiori settori produttivi di applicazione di biotecnologie innovative (BI) e ciò nel pieno concetto di una agricoltura *ecocompatibile o sostenibile* (Matassino, 1997).

Il concetto di sostenibilità o di sviluppo sostenibile viene ritenuto *vago, ambiguo, sfuocato e sfuggente* (Pearce et al., 1989).

Il rapporto *uomo-natura* non può sfuggire alle logiche evolutive del sistema socioeconomico.

Queste logiche possono essere raggruppate in almeno due ampie categorie (Prestamburgo, 1998):

- (a) logica di crescita
- (b) logica di sviluppo sostenibile.

La logica di crescita è caratterizzata, prevalentemente, da un aumento quantitativo di beni e di servizi. Essa persegue una finalità: espansione indefinita delle attività antropiche nel convincimento dell'infinita disponibilità di risorse e dell'insaziabilità dei bisogni umani. Pertanto, questa logica ignora qualsiasi attuazione di iniziative per la salvaguardia delle risorse naturali.

La logica di sviluppo sostenibile (Giaoutzi e Nijkamp, 1993) incorpora tre dimensioni (obiettivi) fondamentali che devono interagire fra di loro: *economica, sociale ed ecologica*. Il diagramma a triangolo equilatero ( *fig. 1.1* ) vuole significare che i tre vertici (A, B e C) indicano la massimizzazione di un solo obiettivo. Le diverse combinazioni all'interno del triangolo consentono

di realizzare soluzioni variabili, temporalmente e spazialmente, in una visione di ottimizzazione dinamica sistemica.

La priorità dovrà riguardare (Matassino, 1992):

- I. la rivitalizzazione delle economie tradizionali;
- II. l'inversione delle uscite di risorse;
- III. il blocco della distruzione delle risorse genetiche animali e vegetali autoctone, allo scopo di mantenere elevato il *carico genetico* e la variabilità genetica; strumenti principe, questi, utilizzati dalla natura per aumentare la *capacità al costruttivismo* degli esseri viventi al mutare delle condizioni ambientali, mediante il sorgere di una moltitudine di *nicchie ecologiche* aperte;
- IV. la modificazione dei modelli attuali di produzione e di consumo allo scopo di ridurre il loro contributo al deterioramento dell'ambiente e di raggiungere nuovi equilibri fra ambiente e sviluppo sostenibile;
- V. il cambiamento di quegli stili di vita che costituiscono fattori di rischio per la sicurezza di un agro-ecosistema culturale.

Pertanto, lo sviluppo più sostenibile è quello in cui le innovazioni tecniche e biotecniche siano inglobate e incorporate nei sistemi produttivi, sociali e culturali esistenti, senza determinare la sostituzione di questi. Questo modello può interessare, ad esempio, le produzioni animali e vegetali, la produzione di energia rinnovabile, il controllo dell'inquinamento, il rendimento dell'energia *nativa*, ecc. (Boyazoglu, 1992; Matassino, 1992). Le produzioni agricole in generale e tutto ciò che è connesso a esse, sono una componente significativa del sistema *agro-alimentare-ambientale* (Matassino, 1996).

Le produzioni agricole in senso lato (zootecnia, produzioni vegetali, produzioni acquacolturali) sono ampiamente candidate a svolgere un ruolo insostituibile, se non primario, nella soluzione dei problemi connessi alla nutrizione umana. È da prevedere un aumento della richiesta di *prodotti nutraceutici o alimenti funzionali (functional foods)* e con certificata sicurezza d'uso (*safety first*).

Le proprietà salutistiche possono variare in relazione alla diversa categoria demografica umana (neonato, bambino, giovane, adulto, anziano); un alimento deve essere funzionale, pertanto, allo stato fisiologico o patologico dell'individuo. Esempi di biomolecole individuate a proposito sono il licopene nel pomodoro, l'oleuropeina nell'olio d'oliva, i CLA (conjugated linoleic acid), ecc.. Le suddette molecole hanno diverse funzioni: antitumorale, antiaterogena, immunomodulante, batteriostatica, antiadipogena, antidiabetogena, promotrice dei fattori di crescita.

I prodotti ittici, in particolare, forniscono proteine di elevato valore biologico, bilanciate nella composizione in aminoacidi essenziali, ricche di metionina e lisina. Tale fattore rende i prodotti

ittici importanti non solo per l'alimentazione della popolazione dei Paesi industrializzati, ma anche per quella delle popolazioni più povere, la cui dieta è spesso basata sul consumo di tuberi o cereali, nei quali tali aminoacidi sono limitati. I prodotti ittici sono anche caratterizzati da una composizione dei grassi particolare che li differenzia dai Vertebrati omeotermi. Questi sono ricchi di acidi grassi polinsaturi, in buona parte a catena lunga (20, 22 atomi di carbonio), e fra questi di particolare rilevanza sono quelli della serie  $\omega 3$ , in particolare l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) dei quali i prodotti ittici sono l'unica fonte alimentare significativa. Come per gli acidi grassi  $\omega 6$ , è stata dimostrata l'essenzialità degli acidi grassi  $\omega 3$ . Nell'uomo gli  $\omega 6$  predominano nelle membrane di muscoli, fegato, rene, adipociti. Studi recenti hanno dimostrato che una dieta mancante di  $\omega 3$  provoca visione ridotta, anomalie nell'elettroretinogramma, profonde modificazioni biochimiche nella composizione in acidi grassi delle membrane di cervello, retina ed altri organi.

Il DHA costituisce il 25-33% degli acidi grassi dei fosfolipidi cerebrali e il 40-50 % nella retina. È stato dimostrato come sia fondamentale con l'allattamento il trasferimento del DHA dalla madre al feto. L'uomo può ricavare tali acidi grassi dal loro precursore, l'acido linolenico (18:3  $\omega 3$ ). Tale capacità può risultare deficitaria in talune situazioni patologiche (diabete, squilibri ormonali), nel digiuno, nell'invecchiamento, quando l'attività delle desaturasi diminuisce di efficienza e quindi diminuisce la possibilità di operare tale trasformazione.

Dall'EPA vengono poi prodotte prostaglandine caratterizzate da un'azione antiaggregante piastrinica, quindi antitrombotica e vasodilatatrice.

L'assunzione abituale di pesce è in grado di determinare un abbassamento del livello dei trigliceridi e del colesterolo diminuendo quindi i fattori di rischio coronarico. Tali acidi grassi, uniti ad un'alimentazione equilibrata, possono quindi contribuire alla prevenzione delle malattie cardiovascolari.

Per tutti questi motivi, l'American Dietetic Association include i prodotti ittici tra i *functional foods* e la quantità di acidi grassi  $\omega 3$  da inserire nella dieta giornaliera (1 g/giorno) viene inclusa, da svariate società di nutrizione Nazionali ed Internazionali, tra i livelli di assunzione raccomandati di nutrienti.

Le sostanze minerali sono presenti nei diversi tipi di pesce in quantità superiore a quella degli animali terrestri. Tra esse meritano di essere menzionate il selenio, lo iodio (nei pesci di mare), il fosforo e lo zinco.

Nei pesci grassi si può segnalare una discreta presenza di vitamine A ed E nel tessuto muscolare mentre nei pesci magri la vitamina A è abbondante nel fegato dove è presente anche la vitamina D.

Molluschi e crostacei hanno una composizione simile al pesce magro, i loro grassi sono anch'essi



ricchi di polinsaturi, in particolare  $\omega 3$ . I molluschi bivalvi sono anche ricchi di ferro, magnesio e zinco.

Attratto da tanti benefici sia in termini quantitativi che qualitativi, l'uomo iniziò a porre le basi per lo sviluppo dell'acquacoltura. L'acquacoltura segna appunto il passaggio dalla semplice attività di raccolta delle risorse ittiche, attraverso le pratiche di cattura della pesca, all'allevamento degli organismi acquatici quali pesci, molluschi, crostacei e piante acquatiche; in acque dolci e salmastre, realizzato attraverso interventi umani (stoccaggio, ingrasso, protezione dai predatori, semina ecc.) finalizzati ad incrementarne la produzione (*Definizione FAO*).

L'acquacoltura è dunque un'attività che affonda le sue radici in tempi molto antichi. Le testimonianze dell'antica Cina, dell'antico Egitto e quelle Fenici e Romane, geograficamente più vicine a noi, ci ricordano il continuo tentativo dell'uomo di intervenire anche sul ciclo vitale degli organismi acquatici per poterne controllare la disponibilità e la proprietà.

Il monaco tedesco Jacobi, che nella seconda metà del Settecento praticò la prima riproduzione artificiale delle trote fario, preso dall'interesse naturalistico per lo studio sulla fecondazione, unendo uova e spermatozoi di trota, aveva aperto la strada all'*innovazione*. Nella metà dell'ottocento iniziarono alcune applicazioni in Francia per riprodurre le trote. Oggi le produzioni di trote, di salmoni, di carpe di varie specie, di spigole ed orate, di gamberoni e di molte specie di molluschi bivalvi, dipendono dagli allevamenti.

*L'acquacoltura ha una grande missione, quella di produrre per soddisfare la crescente domanda di prodotti che la pesca oceanica non può coprire.*

Le aspettative sono molte, ma sono nati anche molti nemici dell'acquacoltura, specialmente dove questa attività è stata svolta in maniera poco responsabile verso l'ambiente.

La ricerca scientifica e tecnologica sta lavorando alacremente per ampliare la gamma delle specie allevabili, per migliorare la qualità dei prodotti, per ridurre l'impatto ambientale che le attività produttive possono generare.

Non è possibile dare un giudizio generale sull'acquacoltura. La qualità dei prodotti dipende dalle modalità di allevamento, dalle tecnologie impiegate e dalla qualità delle acque in cui si alleva.

L'acquacoltura, "sfruttando" i bassi livelli della rete trofica quali fitoplancton, comunità vegetali, catene del detrito, con i suoi elevati rendimenti energetici, potrà garantire inattese crescite produttive di elevata qualità.

Potendo dunque agire su molti fattori, è evidente che l'acquacoltura può offrire opportunità per "costruire" con le buone tecnologie, il meglio per l'economia, per la salute umana e per l'ambiente.

Studiosi, biologi, matematici, economisti ed altri hanno avviato da tempo studi utili a comprendere la limitatezza delle risorse e le conseguenze di un accesso illimitato, sia sull'ecosistema che sul

contesto sociale ed economico interessato.

L'acquacoltura, una risorsa vitale di cibo, di attività lavorative, ricreative e commerciali e di benessere economico per l'umanità, sia per le generazioni presenti che future, dovrà essere condotta in modo responsabile e secondo principi e modelli di comportamento al fine di assicurare un'effettiva conservazione, gestione e sviluppo delle risorse acquatiche viventi, con il dovuto rispetto per l'ecosistema e la biodiversità.

Negli ultimi anni, il crescente interesse sul degrado ambientale marino ha indotto numerosi Paesi ad adottare normative sempre più restrittive in merito allo sversamento di reflui in mare da parte delle aziende di acquacoltura.

Inoltre, la capacità di creare ricchezza senza alterare la rinnovabilità delle risorse biologiche, tentando di recuperare i reflui e riutilizzarli in una qualsiasi altra applicazione, renderebbe il processo ecosostenibile a tutti gli effetti oltre ad abbattere tutta una serie di costi gestionali.

Attualmente lo sviluppo dell'acquacoltura è strettamente legato al potenziale ambientale (acqua, seme, superficie e mano d'opera) e alla domanda del mercato.

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 (capacità di non interferire con gli equilibri naturali) che della sua *ecosostenibilità* (capacità di creare ricchezza senza alterare la rinnovabilità delle risorse biologiche). Un'acquacoltura ecosostenibile è in grado di procurare benessere economico e sociale, garantendo la preservazione delle risorse e dell'ambiente alle generazioni future.

Il Codice di Condotta per una Pesca Responsabile nell'articolo 9 indica le linee di condotta per un'acquacoltura ecocompatibile ed ecosostenibile. Tra queste si ricorda appunto l'esortazione a produrre e aggiornare regolarmente piani e strategie per lo sviluppo dell'acquacoltura e per assicurare che tale sviluppo sia ecologicamente sostenibile e permettere l'uso razionale delle risorse condivise dall'acquacoltura e da altre attività. Inoltre fondamentale è la scelta responsabile delle specie, dell'ubicazione e della gestione delle attività di acquacoltura che potrebbero influenzare gli ecosistemi acquatici nazionali e transnazionali (FAO, 1995).

Il mondo della ricerca si è da tempo messo al lavoro per implementare un modello di sviluppo sostenibile basato sulla conciliazione degli interessi economici e sociali con quelli di conservazione delle risorse naturali, sul lungo periodo.

L'acquacoltura per la sua natura di attività che usa organismi ed ambienti naturali ha una serie di implicazioni ecologiche. Lo sviluppo di modelli ecosostenibili per l'acquacoltura si esplica a due livelli:

- applicazioni ecologiche al miglioramento delle strategie produttive;

- applicazioni dell'ecologia dirette alla misura, al contenimento ed alla prevenzione degli impatti sulla biodiversità a livelli genetici, degli organismi, delle comunità e degli ecosistemi.

Tutte le produzioni basate sull'uso di reti trofiche in ambienti acquatici confinati, con apporti energetici più o meno spinti, dipendono dalla capacità di controllare ed "imitare" processi naturali che normalmente si svolgono negli ecosistemi naturali ( *fig. 1.2* ). Nel caso di una produzione estensiva (*extractive aquaculture*) si tenderà a canalizzare l'energia trofica verso le specie bersaglio, ad esempio riducendo la diversità ed esaltando l'abbondanza delle specie commercialmente interessanti. Questo principio sarà ancor più applicato nella forma semi-intensiva.

Il principio è che tutte le forme di acquacoltura estensiva, ed in parte semintensiva, sono di fatto gestioni ambientali che, per essere ottimizzate, richiedono conoscenze ecologiche di tipo empirico e di tipo scientifico.

Gli impatti dell'acquacoltura sugli ambienti naturali sono legati alla intensificazione delle attività produttive (*fed aquaculture*) che collocano la stessa tra le attività che possono generare danni ambientali (Tancioni e Scardi, 2001)

## **1.2 Acquacoltura intensiva da una prospettiva ecologica**

L'acquacoltura intensiva è un'attività zootecnica basata sull'allevamento monospecifico di specie di elevato pregio commerciale quali spigola e orata, che utilizza risorse naturali, quali l'acqua, e causa mutamenti ambientali, in quanto determina l'immissione nell'ambiente acquatico di reflui caratterizzati da elevate quantità di nutrienti non consumati (Munday et al.,1992; Ackefors and Enell, 1994; Pillay, 1992).

L'acquacoltura intensiva è talvolta percepita dall'opinione pubblica come una industria "non pulita" che produce "pesci in batteria", e quindi di qualità inferiore ai prodotti della pesca. A livello nazionale e comunitario questo ha contribuito ad un'evoluzione negativa dell'attuale quadro di riferimento produttivo, ponendo gli addetti del settore in un evidente stato di difficoltà operativa alla quale, per la trofocoltura, contribuiscono anche le nuove normative in materia di concessioni al prelievo e tutela delle acque dall'inquinamento.

*Tuttavia, nonostante gli impatti ambientali generati ed i problemi energetici che ne limitano la sostenibilità ecologica, l'acquacoltura intensiva non potrà essere sostituita nel breve termine e su scala globale da altre pratiche.*

Nel medio termine, però sarà necessario, anche attraverso il contributo delle discipline ecologiche, ricercare nuovi approcci produttivi che ne consentano la sostenibilità ambientale ed il suo inquadramento tra le attività produttive ecocompatibili (*Environmental Friendly Aquaculture*).

Un tale re-orientamento settoriale, peraltro già stimolato a livello nazionale dal Ministero per le Politiche Agricole e recepito dalle stesse associazioni di categoria, potrebbe essere ottenuto attraverso due approcci consolidati, ovvero la riduzione delle sorgenti d'inquinamento e il riciclo/riuso delle acque di scarico degli impianti a terra.

Il primo approccio, che riguarda più direttamente le produzioni nazionali (triticolture e maricoltura), è finalizzato alla prevenzione o riduzione della produzione di inquinanti (es. nutrienti, sostanze chimiche di sintesi, inquinamento biologico, ecc.), attraverso la riduzione dei carichi, la migliore gestione delle biomasse allevate, la minimizzazione degli stress, l'utilizzo di vaccini, etc.

Il secondo approccio è più frequentemente applicato per impianti intensivi "a ricircolo" ubicati al coperto (es. avannotterie, ingrasso di anguille, ecc.). La maggior parte di questi sistemi prevedono il trattamento delle acque di scarico prima del loro riuso, totale o parziale. Ovviamente, questi sistemi consentono di ottimizzare l'uso delle risorse idriche e di ridurre l'impatto ambientale, ma presentano costi d'investimento molto elevati.

La realizzazione di tali approcci produttivi, ecologicamente più sostenibili, richiede comunque l'internalizzazione dei costi per minimizzare gli impatti per le stesse aziende.

Per il raggiungimento della compatibilità economica le imprese dovranno sviluppare nuove strategie di mercato indirizzate all'inserimento delle produzioni tra quelle "biologiche" e/o ecocompatibili, attraverso specifiche procedure di certificazione dei processi produttivi e dei prodotti. Ciò al fine di consentire la creazione di un valore aggiunto alla produzione, in grado di compensare le perdite derivate dall'internalizzazione dei costi per la mitigazione degli impatti ambientali e per la produzione "biologica".

L'acquacoltura, almeno nelle forme intensive praticate, risponde all'esigenza di produrre specie pregiate, la cui domanda è certamente più elevata della disponibilità basata sulle sole risorse naturali. A differenza di quanto avviene in altri settori della zootecnica, che mirano a produrre organismi erbivori o tutt'al più onnivori, nell'acquacoltura si mira spesso all'allevamento di organismi predatori, quali, ad esempio, la trota o la spigola. La conseguenza di ciò è un'efficienza ecologica ancora più bassa, poiché i mangimi devono necessariamente contenere elevate quantità di proteine animali, a loro volta prodotte attraverso il consumo di biomasse vegetali, ed un impatto ecologico più rilevante, poiché per ogni unità di biomassa ittica prodotta è necessario smaltire un elevato livello di sostanza organica (sotto forma di mangime non consumato e feci) e di escreti azotati.

Da evidenze sperimentali si osserva che i pesci di allevamento assimilano meno del 30% dell'azoto fornito loro con l'alimentazione (Gowen et al., 1987; Hall et al., 1992). Partendo da questo dato è evidente che la maggior parte dei nutrienti sono rilasciati nell'ambiente, contribuendo

all'inquinamento delle acque (eutrofizzazione) e incrementando notevolmente i costi di produzione. In Italia il 70% delle produzioni ittiche di allevamento proviene da impianti di acquacoltura intensivi.

In sintesi, se l'agricoltura consente di "catturare" direttamente l'energia solare per la produzione di alimenti vegetali, l'acquacoltura di specie predatrici implica almeno altre due conversioni di tale energia: dapprima in biomasse animali e poi, attraverso l'uso di queste nei mangimi, in produzione ittica pregiata. Da un punto di vista strettamente energetico è ovvio che ciò comporta un'efficienza piuttosto bassa, di quasi due ordini di grandezza inferiore a quella della produzione agricola. La sostenibilità di questo tipo di produzione, dunque, è strettamente legata alla disponibilità di fonti energetiche esterne, con tutti i limiti che questo tipo di sviluppo impone.

Al di là dei problemi legati allo smaltimento dei cataboliti prodotti dagli organismi allevati, l'impatto ecologico dell'acquacoltura, laddove questa comporti la somministrazione di mangimi, può avere implicazioni anche su più ampia scala. Se per allevare una tonnellata di pesce pregiato sono necessarie da tre a cinque tonnellate di pescato (in generale pesce azzurro) per la produzione dei mangimi, è evidente che la crescita dell'acquacoltura è limitata dalla disponibilità degli stocks ittici naturali. Attualmente si stima che 31 milioni di tonnellate di pesce, pari al 27% del pescato totale su scala globale, vengano destinate annualmente alla produzione di mangimi, di cui il 15% destinati all'acquacoltura. Tuttavia, mentre in altri mangimi la frazione di proteine di origine ittica è modesta, in acquacoltura questa varia dal 20% al 70% e costituisce quindi una componente essenziale. Poiché le biomasse in gioco non sono trascurabili, non è facile stimare l'effetto di tutto ciò sulle reti trofiche degli ecosistemi sfruttati, spesso assai distanti dai siti di allevamento, soprattutto per ciò che riguarda le ripercussioni sui livelli trofici superiori (es. grandi pelagici, uccelli marini e cetacei). Ciò che è certo, comunque, è che questo tipo di sviluppo non è sostenibile nel medio e lungo termine.

Alla luce di tutto ciò, per una effettiva sostenibilità dell'acquacoltura a livello globale è necessaria, almeno nel lungo termine, una profonda reimpostazione dei modelli produttivi, che dovrebbero essere indirizzati sempre più verso il risparmio energetico, il riciclo, il contenimento o la sostituzione delle farine di pesce dei mangimi, ecc. (Tancioni e Scardi, 2001).

### **1.3 Impatto ambientale dell'acquacoltura intensiva**

La zootecnia è un'attività produttiva intimamente legata all'ambiente sia a monte che a valle del ciclo di produzione e, purtroppo, questo legame va sempre più assumendo una connotazione negativa. 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 svolgere al meglio l'attività e ridurre i costi iniziali di installazione, si cerca di sfruttare le risorse naturali esistenti. Così gli impianti vengono realizzati in:

- zone con grandi disponibilità di acqua e di terreni non adibiti ad altre attività;
- in aree di rifiuto o di terreni incolti, in particolare vengono utilizzate aree umide quali paludi, stagni naturali, ecc..

In seguito all'installazione di un impianto di acquacoltura in un'area umida non esistono solo delle conseguenze negative per l'ambiente ma anche dei vantaggi quali:

- maggiore difficoltà di effettuare scarichi civili non controllati nelle vicinanze degli impianti;
- minore velocità di moltiplicazione dei vettori di malattie;
- utilizzo dei rifiuti civili come fertilizzanti;
- ritenzione e drenaggio delle acque.

Inoltre la grande quantità di pesce prodotta negli allevamenti determina una diminuzione dello sforzo di pesca garantendo agli ecosistemi naturali un periodo di maggior riposo (una sorta di *set-aside* naturale, per usare un gergo caro al settore tecnico- politico agrario) seguito da una maggiore produzione e diversificazione delle specie.

In generale, l'impatto ambientale di un impianto di acquacoltura dipende, oltre che dalle sue dimensioni e dalla sua capacità produttiva, dalle specie e dalle tecniche di allevamento, dalla quantità e qualità dell'alimento somministrato, dalle caratteristiche funzionali degli ecosistemi al contorno (es. capacità portante, livelli di resilienza, ecc.).

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, che comporta una quantità elevata e crescente di reflui prodotti: la gestione degli escreti animali è da tempo un problema scottante per l'acquacoltura e in generale per tutte le attività zootecniche.

Dei possibili effetti dell'acquacoltura intensiva sugli ambienti acquatici, per frequenza o severità delle conseguenze, rivestono una maggiore importanza:

- I. Qualità delle acque: aumento torbidità, modifica del pH, riduzione ossigeno disciolto, aumento BOD e COD, apporto nutrienti (N e P), apporto sostanza tossiche (es. antifouling) e residui di chemioterapici, aumento della carica batterica, eutrofizzazione e blooms algali;
- II. Sedimento e comunità bentoniche: aumento della sostanza organica, aumento del BOD e COD del sedimento, diminuzione del potenziale redox del sedimento, produzione di gas ( $H_2S$ ,  $CH_4$ ), incremento composti chimici (antibiotici, antifouling), aumento di ceppi batterici resistenti agli antibiotici, aumento dell'azoto organico ed inorganico, alterazione

delle comunità bentoniche, crescita di alghe;

- III. Popolazioni naturali: introduzione di specie alloctone (possibili effetti di competizione trofica con le specie autoctone), introduzione di individui di popolazioni alloctone (possibile inquinamento genetico), trasmissione di malattie alle popolazioni naturali, introduzione di agenti patogeni esotici, aumento dei predatori in vicinanza degli impianti di allevamento, possibile alterazione delle popolazioni naturali per un uso improprio delle risorse idriche (deflusso minimo vitale);

I principali processi che causano effetti negativi sui corpi idrici ricettori, derivanti dai reflui d'acquacoltura, sono l'*ipernutrizione* (aumento dei nutrienti), l'eutrofizzazione e l'aumento della carica batterica.

Per ipernutrizione si intende qualsiasi sostanziale e misurabile aumento del livello dei nutrienti disciolti (composti a base di azoto, fosforo e potassio) che, a loro volta, provocano l'eutrofizzazione, cioè l'aumento significativo nella crescita del fitoplancton e della produttività primaria.

Il fosforo viene considerato un fattore limitante per le acque interne, mentre l'azoto per le acque marine. Fosforo ed azoto sono essenziali per i pesci, che li ottengono direttamente dalla loro dieta. La maggior parte delle diete li contiene in eccesso (fino al 2% di fosforo e fino al 12% di azoto sul peso secco), o li presenta in forma parzialmente non biodisponibile. L'eccesso di azoto e fosforo ingerito viene escreto, quello non disponibile passa nelle feci.

Processi di eutrofizzazione e fenomeni di *bloom* possono essere di notevole entità soprattutto nei casi in cui gli impianti siano posti direttamente in ambienti acquatici continentali ed in aree marine caratterizzate da ridotto idrodinamismo.

In generale, i nutrienti disciolti che derivano da attività di maricoltura in aree marine caratterizzate da elevato idrodinamismo o da salmonicoltura a terra (i cui reflui vengano fatti confluire nei corsi d'acqua e possono essere rapidamente ed efficacemente diluiti) non causano problemi di eutrofizzazione. Tuttavia la forte concentrazione di più impianti in un'area ristretta, sia in ambiente marino che nelle acque dolci, può innescare processi di eutrofizzazione, anche localizzati, degli ecosistemi marini o lacustri che favoriscono bloom algali, anche nell'ambito della loro normale dinamica stagionale.

Se per le gabbie, per le quali è fondamentale il posizionamento in siti dove la dispersione dei rifiuti solidi sia massima, resta la possibilità di spostarle per permettere al fondo di ripristinarsi (c'è bisogno di un periodo fino a 8 mesi per ripristinare le condizioni iniziali), per gli impianti a terra *le scelte progettuali sono vincolanti*. Tuttavia i margini di intervento ci sono e si è dapprima intervenuti sugli scarichi.

Inizialmente, poiché il trattamento diretto si era dimostrato antieconomico, si pensò di riciclare le acque di scarico, sia per la fertirrigazione (nel caso degli allevamenti in acque dolci), che per *produrre alghe* ed effettuare policoltura, sostituendo così, almeno parzialmente, la fertilizzazione chimica. In alternativa si è proceduto alla depurazione biologica tramite lagunaggio con l'inconveniente di dover reperire spazi da destinare ad un uso di scarso contenuto economico.

In tempi più recenti si è cambiato l'approccio:

*controllare la qualità delle acque di scarico intervenendo sulle cause  
lungo tutto il ciclo di produzione.*

Il risultato è una nuova tipologia di impianto che recupera e ricicla l'acqua d'allevamento mediante depurazione e mediante l'utilizzo di mangimi per i quali si è ottimizzata l'efficienza di assunzione dell'azoto e del fosforo, migliorata la digeribilità e minimizzata la dispersione (Tancioni e Scardi, 2001).

Per quanto riguarda gli aspetti *igienico-sanitari* dobbiamo evidenziare come, a fronte di una similitudine tra reflui urbani ed emissioni di impianti acquacolturali intensivi (in-shore ed off-shore) per ciò che riguarda il rapporto azoto totale su fosforo totale, le differenze qualitative e quantitative in termini di carica microbica sono tuttavia apprezzabili.

Un primo motivo di ciò sta nel fatto che le emissioni di attività di piscicoltura non hanno la stessa quantità di patogeni che caratterizza i reflui urbani, anche se alcuni microrganismi che sono patogeni per i pesci possono agire anche nell'uomo. D'altra parte, in circostanze occasionali sia i pesci che le loro deiezioni possono contenere microrganismi patogeni per l'uomo, anche se generalmente non si tratta di ceppi capaci di indurre patologie preoccupanti. Inoltre circa il 70-80% dei farmaci usati negli allevamenti finiscono nei corpi idrici recettori e nel sedimento nei pressi degli impianti di allevamento, raggiungendo alte concentrazioni. Molti farmaci (come ossitetraciclina clorata e quinoloni) sono molto persistenti nei sedimenti. L'uso di questi antibiotici può ovviamente indurre lo sviluppo di forme di resistenza nei ceppi batterici patogeni per i pesci e, almeno potenzialmente, di ceppi patogeni per l'uomo (Cataudella e Bronzi, 2001).

#### **1.4 I reflui**

La legislazione italiana definisce, attraverso decreti legislativi, gli standard di qualità da rispettare per il rilascio dei reflui prodotti da attività industriali. Gli impianti di acquacoltura, come gran parte delle produzioni zootecniche, producono reflui caratterizzati da elevato contenuto in azoto (N) e fosforo (P) che, come detto in precedenza, rilasciati nell'ambiente causano fenomeni di eutrofizzazione.

Il D.L. n 152, approvato l'11 maggio 1999, definisce in linea generale la disciplina per la tutela



delle acque superficiali, marine e sotterranee perseguendo diversi obiettivi. Disposizioni correttive ed integrative del D.L. 152/99 sono riportate nel D.L. n 258 del 18 Agosto 2000.

Le finalità principali di tale decreto riguardano soprattutto:

- la prevenzione e la riduzione dell'inquinamento delle acque;
- la diminuzione del carico inquinante per i corpi idrici già inquinati;
- il miglioramento dello stato generale delle acque;
- la protezione delle acque destinate a usi particolari al fine di mantenere la naturale capacità autodepurante dei corpi idrici e di conseguenza proteggere le comunità vegetali ed animali esistenti.

Per il raggiungimento e il mantenimento degli standard di qualità la legislazione obbliga le imprese ad adottare le migliori tecniche disponibili per eliminare o ridurre sostanze pericolose presenti negli scarichi. Le singole industrie devono dunque valutare e caratterizzare i propri reflui.

I principali parametri da considerare sono:

- *Sostanza organica solubile*, che determina una diminuzione dell'ossigeno disciolto nelle acque riceventi.
- *Solidi sospesi*, che determinano una riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto, dando luogo alla produzione di gas maleodoranti.
- *Composti organici*, quali fenoli, possono impartire odori e sapori indesiderati alle acque richiedendo ulteriori trattamenti di potabilizzazione.
- *Colore e torbidità* non fanno sorgere particolari problemi in quanto non si tratta di caratteristiche deleterie e nocive, ma rivestono importanza soprattutto dal punto di vista estetico.
- *Azoto e fosforo*, genericamente indicati come nutrienti, sono particolarmente indesiderati nell'effluente quando lo scarico si riversa in taluni tipi di recettori come laghi, fiumi. L'eccessiva presenza e concentrazione di azoto e fosforo in sedimenti acquatici aumenta la possibilità di fenomeni di eutrofizzazione.
- *Composti refrattari*, contenuti in detergenti possono essere indesiderabili in quanto non essendo biodegradabili determinano la formazione di schiume nelle acque riceventi. Talune sostanze refrattarie, inoltre, possono risultare tossiche per certe forme di vita acquatica.
- *Oli e materiali galleggianti* sono soggetti a limitazioni per lo scarico soprattutto a causa dei problemi estetici che determinano.
- *Composti volatili*, come l'anidride solforosa, danno origine a problemi di inquinamento atmosferico. La legislazione definisce i limiti per il loro rilascio nell'ambiente (Wesley Eckenfelder Jr, 1993).

## 1.5 Il Trattamento dei reflui

Esistono diverse tipologie di trattamento dei reflui. Un impianto di depurazione tradizionale è basato, generalmente, su un gruppo di processi tradizionali di trattamento primario e secondario, ed include inoltre processi di trattamento terziario. I liquami privi di sostanze tossiche vengono processati attraverso trattamenti di tipo primario e secondario (*fig. 1.3*).

I *processi primari*, simili a quelli utilizzati in impianti di depurazione dei reflui urbani, hanno lo scopo di preparare il liquame al trattamento biologico attraverso la rimozione dei solidi grossolani mediante grigliatura e delle particelle sospese di materiale inorganico per sedimentazione.

Se alla miscelazione del volume liquido viene integrata una efficace aerazione si può ottenere già in questa fase una parziale ossidazione dei composti che si trovano inizialmente nelle acque.

Per la rimozione di oli, grassi e solidi sospesi si può effettuare una fase di sedimentazione. Questo processo può avvenire attraverso modalità differenti: sedimentazione discreta, sedimentazione fioccosa e sedimentazione a zone. Il verificarsi di uno di questi tipi di processo dipende principalmente dalla natura dei solidi presenti nel liquame.

Il *trattamento secondario* consiste invece nella degradazione biologica dei composti organici solubili. Solitamente vengono impiegati processi di tipo aerobico, in vasche scoperte ed aerate, talvolta integrate da un pretrattamento anaerobico in vasche coperte. Dopo il trattamento biologico, i microrganismi e gli altri solidi che si trovano in sospensione nel liquame vengono allontanati per gravità dalla fase liquida.

E' importante far notare che i metalli pesanti prima del trattamento secondario dovrebbero essere rimossi tramite operazioni di pretrattamento poiché potrebbero risultare tossici alla biomassa.

Il *trattamento terziario* viene aggiunto a valle del trattamento biologico per rimuovere specifiche sostanze inquinanti: ad esempio, si può effettuare la filtrazione per la rimozione di solidi colloidali, o si può effettuare adsorbimento su carbone attivo od ossidazione chimica per la rimozione di composti organici

Questi processi sono comunque onerosi in quanto devono trattare notevoli volumi di liquami e talvolta possono risultare inefficienti dal momento che molti non reagiscono specificamente con un solo inquinante. I liquami contenenti elevate quantità di metalli pesanti, pesticidi ed altre sostanze che potrebbero attraversare inalterate il trattamento primario, ed interferire successivamente col trattamento biologico, devono necessariamente essere sottoposti ad un trattamento intermedio.

I processi comunemente utilizzati per questo scopo includono comunemente: precipitazione, adsorbimento su carbone attivo, ossidazione chimica, scambio ionico, osmosi inversa ed ossidazione ad umido.

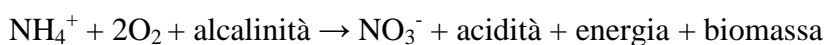
Tutti i processi citati hanno un ruolo ben definito nello schema più generale di trattamento. La

selezione di un processo, o di una combinazione di processi di trattamento, dipende da diversi fattori. Prima della scelta finale del processo dovrebbe, infine, essere fatta una valutazione dettagliata e comprensiva del costo del trattamento e della disponibilità delle aree per la realizzazione dell'impianto (Wesley Eckenfelder Jr, 1993).

Gli *impianti di depurazione biologica* rappresentano per le attività zootecniche il miglior sistema di depurazione delle acque reflue in quanto riescono ad ottenere rendimenti di depurazione vicini al 95-96%.

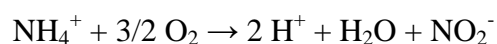
Il filtro biologico costituisce il fulcro fondamentale della depurazione, permettendo l'ossidazione aerobica di cataboliti azotati, quali ammoniaca e nitriti, a nitrati. Con il termine "nitrificazione" si intende l'ossidazione biologica dei composti inorganici dell'azoto ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_2^-$ ) ad opera di batteri nitrificanti (*fig 1.4*).

L'ossidazione dell'azoto ammoniacale ( $\text{N-NH}_4^+$ ) determina la formazione dell'azoto nitrico ( $\text{N-NO}_3^-$ ) mediante la formazione di un prodotto intermedio, l'azoto nitroso ( $\text{N-NO}_2^-$ ). Siccome l'azoto ammoniacale e l'azoto nitroso risultano tossici per gli organismi acquatici è necessario un loro abbattimento prima dell'emissione. 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, per l'idrogeno altre fonti disponibili sono l'aria e l'acqua. La nitrificazione può essere spiegata nell'unica reazione:



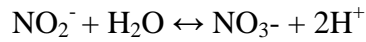
Il processo ossidativo si svolge però in due stadi:

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



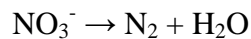
Questo primo processo ossidativo, che risulta irreversibile, produce acidità e consuma ossigeno. L'ammonio è tossico a pH superiori a 7 perché inizia a trasformarsi in ammoniaca, mentre lo ione nitrito è tossico a tutti i pH, entrando in competizione con l'ossigeno per i siti di legame presenti nell'emoglobina del sangue degli organismi acquatici formando metemoglobina, un'emoglobina modificata del tutto incapace di trasportare ossigeno; questo tipo di intossicazione è analoga a quella che colpisce i mammiferi esposti ad alte concentrazioni di monossido di carbonio (CO).

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:



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. In questa equazione non compaiono ioni  $\text{H}^+$ , ma viene ancora consumato ossigeno, anche se meno che nel primo passaggio.

Lo ione prodotto, il nitrato, è relativamente innocuo e può accumularsi in acqua senza risultare tossico. È importante mantenere la concentrazione al di sotto dei 200 mg/l. I metodi più comuni per la diminuzione della concentrazione di questa sostanza sono o diluire con parziale ricambio di acqua o una reazione anaerobica ad opera di batteri che garantiscono la riduzione anche a concentrazioni di ossigeno ridottissime dell'azoto nitrico in azoto gassoso e acqua secondo la reazione:



Per questa reazione è necessario un apporto di carbonio organico, che può essere preso o dal materiale organico prima che il refluo passi attraverso il filtro meccanico oppure possono essere effettuate delle aggiunte con altri prodotti.

Il metabolismo dei nitrosanti viene sostenuto non solo dalla presenza di ossigeno, azoto e idrogeno, altri elementi infatti entrano nella reazione e vengono consumati. La sola fonte di carbonio per la sintesi della biomassa nitrificante è rappresentata dai carbonati oppure dai bicarbonati.

Le caratteristiche progettuali del biofiltro come volume, area della colonna, porosità del supporto e velocità del flusso idrico che lo attraversa sono elementi che condizionano il funzionamento del sistema. Se il flusso dell'acqua che entra nel filtro biologico avesse una velocità elevata, i nitrosanti non avrebbero la possibilità di entrare in contatto con i composti organici da degradare, al contrario invece se la velocità di flusso fosse troppo bassa i batteri potrebbero avere insufficiente apporto di ossigeno e di nutrienti oltre che una troppo lenta rimozione dei cataboliti. 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  $\text{m}^2/\text{m}^3$  e sono definiti a "bassa densità", mentre altri ad "alta densità" hanno uno sviluppo superficiale da 400-2000  $\text{m}^2/\text{m}^3$  (Saroglia, 2001).

## **1.6 Il rapporto tra Acquacoltura Intensiva, Qualità ed Ecosostenibilità-Ecocompatibilità**

Una recente sessione della FAO Committee on Fisheries (COFI) ha messo in luce il ruolo complementare dell'acquacoltura nella produzione di pesce per l'alimentazione umana e la sua capacità di alleviare la povertà in molte aree rurali. Le proiezioni globali per il futuro vedono tali produzioni in continuo aumento. La promozione di un'acquacoltura sostenibile è divenuta una esigenza sia nei Paesi a più alto reddito sia nei Paesi Terzi dove tali produzioni, che spesso costituiscono un'integrazione ad una dieta carente di importanti principi nutritivi (proteine di buon valore biologico, acidi grassi essenziali, ferro, ed altri elementi minerali), sono in molti casi ottenute attraverso forme di acquacoltura integrata o altre piccole realtà produttive, con l'impiego di tecnologie tradizionali di tipo estensivo. Nelle Società Sviluppate, invece, il soddisfacimento dei bisogni primari è stato ampiamente raggiunto ed i consumatori occidentali hanno modificato le aspettative rivolgendo la loro attenzione alla qualità dei prodotti, alla loro salubrità e ai modelli di vita più appaganti. Nello stesso tempo è sorta la consapevolezza di una qualità del prodotto sempre più legata alla qualità dell'ambiente. La filosofia della sostenibilità e della valorizzazione e conservazione delle risorse naturali con il mantenimento di determinati equilibri è uno dei temi portanti, oltre che per il settore pesca, di tutto il sistema agroalimentare. A tal fine, si sono sviluppate tecnologie di allevamento sempre più evolute, con il duplice intento del rispetto dell'ambiente e dell'ottenimento di un prodotto di elevata qualità, sicurezza d'uso e con caratteristiche nutrizionali quanto più simili a quello selvaggio. Molte aziende hanno predisposto disciplinari tecnici di produzione allo scopo di avviare un processo di certificazione del prodotto e dell'intero sistema produttivo. Allo stesso modo è nata l'esigenza di informare il consumatore, come richiamato oltre che dal Codice di Condotta per la Pesca Responsabile redatto dalla FAO anche dal Regolamento (CE) n.104/2000 del Consiglio del 17/12/1999 relativo all'Organizzazione Comune dei Mercati per la Pesca ed Acquacoltura e dal Regolamento (CE) n.2065/2001 della Commissione del 22/10/2001, da realizzarsi attraverso forme di etichettatura che consentano la tracciabilità del prodotto allo scopo di permettere al consumatore una scelta responsabile.

## **1.7 Innovazione di processo**

Un'innovazione a livello di processo, in tale settore, consiste nell'applicazione del principio del trattamento e della riutilizzazione del mezzo di coltura di tutti gli organismi allevati (fitoplancton, zooplancton, larve) con la tecnica del *mesocosmo* (fig. 1.5) nel corso di una prova di larvicoltura di una specie ittica, meglio se autoctona e innovativa per il nostro Paese come ad esempio il rombo chiodato (*Psetta maxima*).

Da un lato il sistema a circuito chiuso consente di trattare l'acqua fisicamente, chimicamente e batteriologicamente permettendone il riutilizzo da parte proprio di quegli organismi che hanno prodotto il refluo, dall'altro il mesocosmo, ricreando nello stesso ambiente la catena trofica naturale, rappresenterebbe una polimicrocoltura in grado di darci contemporaneamente concrete ed importanti risposte sulla bontà del sistema sia dal punto di vista produttivo che ecologico.

Infatti il mesocosmo rappresenta una tecnica di allevamento larvale, ma potrebbe rappresentare un complesso test ecotossicologico di laboratorio mediante l'utilizzo di una variegata e ampia batteria di organismi marini (batteri, zooplancton, fitoplancton, larve) per la valutazione della tossicità (acuta, cronica e sub-letale) di acqua di allevamento di diversa origine sottoposta a continui trattamenti e riutilizzo.

Sebbene sia ben noto che le alghe preferiscano utilizzare  $\text{NH}_4^+$  come fonte di N (Przytocka-Jusiak et al., 1984), si preferisce utilizzare un filtro biologico per la l'abbattimento di ammoniaca e nitriti con la formazione di nitrati meno tossici a medio-basse concentrazioni per gli altri organismi utilizzati durante la sperimentazione. L'azoto ammoniacale e nitroso risultano tossici non solo per i pesci ma anche per gli stessi batteri nitrificanti. La tossicità dell'ammoniaca indissociata per le specie del genere *Nitrosomonas* risulta compresa tra 10-150 mg/l. *Nitrobacter* è più sensibile (0,1 mg/l), in acqua dolce l'azoto nitroso risulta tossico a 1 mg/l. Gli incrementi di tali composti risultano nocivi prima per i pesci che per i batteri in quanto la concentrazione tossica per la popolazione ittica è nettamente inferiore.

Per la crescita di giovanili di *Psetta maxima* il NOEC (no-observable effect concentration) è 0,18 ppm di ammonio non ionizzato. Il rapporto  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  è influenzato dalla temperatura e dal pH dell'acqua.

Il *Brachionus sp.* elimina la maggior parte dei composti azotati sotto forma di ammoniaca e urea (Hirata e Nagata, 1982). La tossicità dell' $\text{NH}_3$  per i rotiferi non è certa anche se sembra che siano abbastanza resistenti a questa molecola. Dhert (1996) ritiene che alti livelli di ammoniaca non ionizzata siano tossici per i rotiferi e individua il valore 1 mg/l di  $\text{NH}_3$  come concentrazione limite per l'allevamento intensivo. Suantika et al. (2003) hanno portato a termine uno studio di fattibilità sull'uso del sistema a ricircolo per la produzione massiva di rotiferi concluso in modo promettente sia per i benefici economici che tecnici. Zmora (2005) ha valutato la possibilità di allevare *Artemia salina* a circuito chiuso utilizzando anche prodotti agricoli per l'alimentazione degli adulti.

## **1.8 Innovazione di prodotto**

In presenza di un continuo incremento della domanda di prodotti ittici, le stagnanti produzioni di pescato fanno sì che siano affidate all'acquacoltura le maggiori aspettative per soddisfare le

esigenze della popolazione.

Le difficoltà incontrate nell'introduzione di nuove specie sono in gran parte legate all'ottenimento degli stadi giovanili con sistemi di riproduzione assistita, in quantità tali da poter attivare le successive fasi di allevamento. Altre problematiche riguardano la scelta del sistema di allevamento più opportuno e i programmi di alimentazione. Tra le varie specie per le quali si sta lavorando per il perfezionamento delle tecniche di allevamento, abbiamo appunto *Psetta maxima* o rombo chiodato. Le caratteristiche positive che hanno condizionato la scelta del rombo chiodato come specie oggetto di studio sono molteplici, e in prospettiva futura, l'introduzione in Italia di allevamenti intensivi potrebbe rafforzare il comparto e garantire uno sviluppo tecnologico ed occupazionale.

La collaborazione internazionale tra il CRIACq e il Centro Oceanografico di Murcia in Spagna ha consentito di dare inizio alle prove di larvicoltura di rombo (*Psetta maxima*).

*Psetta maxima* è un ottimo candidato per l'allevamento per il suo rapido accrescimento, adattamento alla cattività, resistenza alle manipolazioni, capacità di riprodursi in cattività ed infine per il suo elevato valore commerciale.

*Psetta maxima* è un pesce piatto appartenente all'ordine dei *Pleuronettiformi*, alla famiglia degli *Scoftalmidi* e alla classe degli *Actinopterygi* (pesci con pinne raggiate).

Il suo corpo risulta largo, romboidale e asimmetrico, con entrambi gli occhi sul lato sinistro, come tutti i pesci piatti (*fig. 1.6*). Il rombo chiodato è un pesce demersale, che vive su fondali sabbiosi e ghiaiosi, meno frequente su quelli fangosi, ad una profondità di 25-80 m; si allontana dalla costa man mano che diventa adulto. Il rombo vive al buio: a due settimane di vita gli occhi si spostano sullo stesso lato per poter concentrare lo sguardo sulla preda in ambienti poco luminosi.

Il ciclo di allevamento larvale ha inizio simbolicamente con la fecondazione delle uova e termina allo svezzamento con il passaggio definitivo da un regime dietetico vivo a quello definitivo a base di mangimi inerti dapprima polverulenti e in seguito pellettati.

## **1.9 Caso studio: larvicoltura di rombo chiodato (*Psetta maxima*) allevato in mesocosmo**

### **1.9.1 Produzione di uova**

La deposizione delle uova avviene in primavera-estate, da aprile a luglio, ed è sequenziale poiché l'ovario matura in maniera non sincronica.

Il numero di uova prodotte è molto variabile e può superare un milione di uova per femmina. Normalmente si considerano deposizioni di  $400-500 * 10^3$  uova/kg P.V..

Il diametro delle uova è di 1-1,1 mm. La larva appena schiusa misura 3 mm ed è pelagica e simmetrica. Dopo un mese di vita comincia la metamorfosi che dura circa 20-30 giorni e alla termine della quale si raggiunge la tipica asimmetria e il comportamento bentonico. La taglia a

questo punto è circa 2 cm.

La deposizione delle uova può essere spontanea o indotta per massaggio addominale.

Nel primo caso la qualità della deposizione è molto variabile, per cui alla deposizione spontanea si preferisce la tecnica del massaggio addominale.

Il rombo matura le gonadi e ovula, ma le uova espulse si ritengono nell'ovario e non si ha l'ovideposizione. Dopo l'ovulazione, diminuisce rapidamente la qualità delle uova, per questo motivo gli ovociti vanno raccolti quando sono stati recentemente ovulati. Un buon metodo per conoscere il tempo trascorso dalla ovulazione è la misura del pH del fluido ovarico, che si abbassa da 8 a 7 nel momento in cui inizia la sopramaturazione.

Le uova raccolte con la tecnica del massaggio addominale vengono quindi inseminate artificialmente mediante una fecondazione a secco in seguito alla quale si procede all'incubazione delle uova della durata di circa 65-70 °d (5 giorni a 14°C) in incubatoi con una densità compresa tra le 1.000 - 5.000 uova/l. L'incubazione delle uova viene realizzata al buio ad una temperatura di 13-15°C in quanto a temperature maggiori avremo un tasso minore di schiusa ed una maggiore percentuale di larve deformi. Generalmente il tasso di schiusa è del 70% a partire da un tasso di fecondazione pari al 60%.

Il momento migliore per il trasporto è quello dopo la schiusa, in tali condizioni avremo fino a 0,5 – 1 \* 10<sup>5</sup> larve/l.

### **1.9.2 Coltura larvale**

La fase dell'allevamento larvale è la più complessa e dispendiosa a causa della necessità di fornire prede vive alle larve. Possono essere impiegati sia il sistema intensivo che quello semi-intensivo.

Nelle colture intensive il rinnovo dell'acqua è continuo dall'inizio dell'allevamento larvale. Le colture intensive prevedono una densità larvale pari a 10 larve/l, con una sopravvivenza variabile tra il 10-20 %.

Il mesocosmo, invece, è un circuito chiuso con rinnovo parziale che si apre tra il 10° e il 15° giorno in base ai seguenti parametri: O<sub>2</sub> > 6 ppm e NO<sub>2</sub> < 0,25 ppm. Esso rappresenta un sistema di coltura semi-intensivo. La densità larvale può variare da 2 a 10 larve/l e la sopravvivenza è più alta, il 40 % circa.

Nel corso dell'allevamento larvale risultano particolarmente critici tre periodi a causa di una mortalità più o meno elevata delle larve:

- I. 0 (fecondazione) - 5 giorni: la mortalità risulta molto variabile e dipende essenzialmente dalla quantità della deposizione;
- II. 5 - 8 giorni: elevata mortalità (a volte fino al 50 %) che colpisce le larve che non sono capaci di alimentarsi predando;



III. 15 - 20 giorni: mortalità molto variabile in base alla metamorfosi delle larve.

Si parte da una taglia iniziale di 3 mm fino a raggiungere quella finale (età dello svezzamento) di circa 20 mm.

Per quanto riguarda il colore, è preferibile che le vasche siano di colore scuro per facilitare la visione delle prede. È necessario, inoltre, che esse siano dotate di vari punti di aerazione. Le condizioni di luce prevedono un regime di fotoperiodo continuo (24 ore di luce) fino alla fine dello svezzamento, dopodiché tale regime cambia passando a 16-18 ore di luce.

Per quanto riguarda la qualità dell'acqua, essa deve essere sterilizzata e filtrata a 1 µm.

Infine, è importante rispettare i livelli ottimali, per questa fase, di temperatura dell'acqua nelle vasche (18-20 °C) e salinità (circa 30-35 ‰).

### 1.9.3 Sviluppo larvale

- Schiusa: le larve misurano circa 3 mm di lunghezza e pesano tra 0,1 e 0,2 mg. Sono poco attive, nuotano passivamente sulla superficie dell'acqua, quindi sono pelagiche. Sono cieche, simmetriche e hanno l'ano e la bocca chiusa. Appena nate, le larve sono ancora provviste del sacco vitellino (*fig. 1.7*);
- 2° - 3° giorno: aprono la bocca e l'ano. Si osservano le pinnette pettorali. Gli occhi si pigmentano e diventano più attivi. Cominciano ad acquisire una pigmentazione scura. Il sacco vitellino è stato parzialmente riassorbito (*fig. 1.7*);
- 5° - 6° giorno: totalmente riassorbito il sacco vitellino; comincia a gonfiarsi la vescica natatoria (*fig. 1.7*);
- 7° - 8° giorno: la goccia oleosa si riassorbe totalmente (fine della fase vitellina). Le larve nuotano attivamente, la loro acutezza visiva è maggiore e cominciano a comportarsi come veri predatori, distribuendosi in tutta la vasca. La loro pigmentazione diventa più chiara.
- 15° giorno: la larva misura circa 7 mm, lo stomaco e tutte le ghiandole digestive funzionano pienamente (*fig. 1.7*);
- 18° - 20° giorno: comincia la metamorfosi. La larva misura 8-10 mm e il suo peso è di 5-8 mg. La vescica natatoria è ancora gonfia e inizia la migrazione dell'occhio destro fino alla parte sinistra. La larva comincia a diventare piana e asimmetrica (*fig. 1.7*);
- 30° giorno: la larva misura circa 15 mm e ha già terminato la migrazione dell'occhio destro. La vescica natatoria comincia a riassorbirsi, la larva inizia ad esplorare il fondo della vasca e a diventare demersale.
- 40° - 45° giorno: dalla nascita la metamorfosi è completata; la vescica natatoria si è riassorbita totalmente e l'avannotto vive sul fondo. La parte destra del corpo ha perso la pigmentazione. Il suo peso sarà 0,1 - 0,15 g (*fig. 1.7*);

#### **1.9.4 Alimentazione larvale**

L'alimentazione delle larve rappresenta un aspetto molto importante e delicato durante il primo periodo di sviluppo poiché le larve alla nascita sono di dimensioni ridotte, con organi di senso e tratto digerente non completamente sviluppati.

Di conseguenza il tipo di alimento utilizzato dovrà essere appetibile, digeribile e di dimensioni proporzionate a quelle della bocca. Attualmente sono utilizzati organismi acquatici che in natura fanno parte della dieta delle larve.

Questi ultimi, oltre ad essere di piccole dimensioni e facilmente digeribili, si muovono in continuazione stimolando in tal modo le larve ad alimentarsi. Questo movimento del cibo vivo nella vasca assicura inoltre una omogenea distribuzione nella colonna d'acqua, facilitando incontri più frequenti tra larve e preda.

Oggi sono fondamentalmente tre le tipologie di cibo vivo utilizzato nel corso della coltura larvale: microalghe, rotiferi e artemie (*fig. 1.8*). Sono in corso sperimentazioni per la sostituzione di rotiferi ed artemia con copepodi e nuove tecniche di allevamento e arricchimento dello zooplancton.

Per lo sviluppo è necessario soddisfare le esigenze nutrizionali somministrando specifici nutrienti per le differenti fasi di vita.

Durante la prima settimana di vita planctonica, le larve riassorbono il tuorlo contenuto nel sacco vitellino. Il primo nutrimento somministrato è rappresentato dal fitoplancton in associazione allo zooplancton fino ad arrivare ad una taglia tale da poter essere alimentato attraverso diete inerti.

#### **1.9.5 Rotiferi**

I rotiferi sono i primi organismi zooplanctonici utilizzati per l'allevamento larvale per i seguenti motivi:

- taglia adatta all'alimentazione delle larve nella loro prima fase di vita;
- organismi euritermi ed eurialini;
- alta frequenza riproduttiva;
- composizione biochimica variabile a seconda delle necessità.

Si tratta di animali microscopici, pseudocelomati, di varie dimensioni, forma e colorazione. Essi possono misurare da 0,1 a 2 mm, anche se solo raramente superano 0,5 mm di lunghezza.

La loro caratteristica peculiare è la presenza di una o più corone ciliate rotanti, poste attorno all'apertura orale, da cui prendono il nome.

La parte anteriore del loro corpo è fornita di un disco retrattile che porta sul margine una o due serie di ciglia vibratili, il cui movimento crea un vortice che convoglia l'acqua (contenente ossigeno e sostanze nutritive) verso la testa, aspira le prede, elimina i prodotti di rifiuto e promuove la locomozione (da cui il nome rotiferi).

Le femmine predominano sulle popolazioni della maggior parte dei rotiferi. Esse hanno un unico ovario e le uova migrano nella cloaca attraverso un ovidotto. Il maschio è molto più piccolo della femmina e ha una vita breve.

I rotiferi si rinvencono in laghi, in piccoli specchi d'acqua dolce, in ambienti salmastri ed astatici, in suoli umidi, nel muschio e su licheni umidi, praticamente dovunque sia disponibile una se pur minima quantità di acqua o di umidità; sono raramente presenti in acque marine.

Il ciclo vitale di questi organismi presenta molte caratteristiche affascinanti, tra cui la particolare forma di partenogenesi ciclica (eterogonia) che essi esibiscono al cambiare delle condizioni ambientali e delle stagioni.

Molte popolazioni sono primariamente costituite da femmine diploidi che producono uova diploidi (amittiche) in grado di svilupparsi in femmine adulte senza fecondazione (queste sono le uova che vengono selezionate in condizioni di allevamento). Queste uova vengono prodotte approssimativamente ogni 4 ore e rappresentano la modalità più classica per riprodursi.

In alcuni casi, soprattutto quando le condizioni ambientali diventano sfavorevoli (prosciugamento di uno specchio d'acqua, estati molto calde, ecc.), le femmine producono uova normali, aploidi, alcune delle quali si sviluppano partenogeneticamente in maschi, altre in femmine; in tali periodi le femmine possono produrre anche uova mittiche che possono essere fecondate.

Queste uova aploidi, a seconda che vengano fecondate o meno, seguono due destini differenti:

- se non vengono fecondate danno origine a maschi aploidi;
- se vengono fecondate aumentano di dimensione e si rivestono di un involucro esterno granulare e denso prendendo il nome di cisti, "stadi resistenti" che riprendono lo sviluppo in condizioni favorevoli e si trasformano in femmine, con corredo cromosomico diploide, che si possono successivamente riprodurre per partenogenesi.

Per quanto riguarda i maschi, questi hanno dimensioni pari ad un quarto di quelle delle femmine; non hanno né il tratto digestivo né la vescica e possiedono un solo testicolo sovradimensionato in cui normalmente sono presenti circa 50 spermatozoi maturi.

Da quanto su esposto risulta evidente che la maggior parte dei rotiferi è costituito da femmine; i maschi generalmente rappresentano circa il 10% delle relative popolazioni, o sono presenti solo per alcune settimane l'anno.

I rotiferi somministrati nel corso dell'alimentazione larvale sono specie appartenenti al genere *Brachionus* (classe *Monogonta*, ordine *Ploimidia*, famiglia *Brachionidae*): si tratta di due ceppi o morfotipi che differiscono per dimensioni, forma e condizioni di coltivazione:

- ceppo L, specie *Brachionus plicatilis*: dimensioni variabili tra i 160-340  $\mu\text{m}$ , in media 240  $\mu\text{m}$ , le spine della lorica hanno angoli ottusi, non molto appuntiti.

- ceppo S, specie *Brachionus rotundiformis*: dimensioni comprese tra i 100-210  $\mu\text{m}$ , in media 160  $\mu\text{m}$ , le sue spine sono appuntite e affilate e la sua forma è più arrotondata (forma di coppa).

Le condizioni ottimali per la coltivazione dei rotiferi appartenenti al genere *Brachionus* sono le seguenti:

- aerazione moderata;
- condizioni di luce simile a quelle richieste dal fitoplancton;
- concentrazione di ossigeno prossima alla saturazione;
- temperatura ottimale per lo specifico ceppo ( 23 – 25 °C per il ceppo L, 27 – 28 °C per il ceppo S);
- pH tra 7,5 e 8,5;
- acqua sterilizzata e filtrata a 1  $\mu\text{m}$ ;
- salinità tra i 25 - 38 gr/l;
- le vasche di coltura devono avere due uscite, una per lo spurgo, l'altra per la raccolta.

La produzione dei rotiferi deve seguire la domanda giornaliera proveniente dall'allevamento larvale; pertanto la loro disponibilità deve essere prevista in termini di quantità e in base al momento opportuno per la loro somministrazione.

L'alimentazione dei rotiferi può avvenire mediante la somministrazione di lievito o di fitoplancton, o anche di entrambi contemporaneamente, oppure essi possono essere alimentati mediante diete artificiali.

Nel caso dei lieviti, vanno somministrati 0,3-0,4 gr di lievito secco/ $10^6$  rotiferi, preventivamente sciolto in acqua dolce fino al raggiungimento di una concentrazione che non superi i 50gr/l. Il lievito risulta ottimo per le sue dimensioni (5-7  $\mu\text{m}$ ), adatte alla grandezza della bocca e alla taglia dei rotiferi, e per l'elevato tenore in proteine, anche se risulta carente in acidi grassi.

Nel caso di alimentazione a base di fitoplancton, vanno somministrate 1,5 -2,0 \*  $10^3$  cellule di *Tetraselmis suecica* / rotifero oppure 8,0 -1,2 \*  $10^3$  cellule di *Isochrysis galbana* / rotifero. Generalmente il fitoplancton viene utilizzato come supplemento per l'alimentazione a base di lievito.

L'arricchimento può essere effettuato mediante l'aggiunta di fitoplancton (generalmente per 500 rotiferi/ml si aggiungono 4.000 cell *Isochrysis galbana* /  $\mu\text{l}$ ) oppure aggiungendo prodotti commerciali contenenti, allo stato secco, DHA, proteine, ecc..

Per la coltivazione dei rotiferi sono tre i principali sistemi adottati:

- Sistema in discontinuo. È il metodo più comune per la produzione di rotiferi in acquacoltura. Tramite inoculi successivi a partire dai ceppi madre, si passa a volumi progressivamente più grandi fino a quando si raggiungono le quantità e le densità volute. I rotiferi così prodotti

vengono raccolti per l'alimentazione larvale. Fondamentale è l'inoculazione di nuovi volumi con popolazioni a densità sufficientemente alte per assicurare una rapida crescita dello stock e inibire la crescita di organismi competitori. I vantaggi di questa tecnica sono:

- facilità d'esecuzione: si riempie la vasca all'inizio del ciclo e si svuota a fine ciclo senza necessità di interventi intermedi;
  - buoni tassi riproduttivi: cicli brevi di produzione limitano l'accumulo di sostanze inquinanti nell'ambiente capaci di inibire l'efficienza riproduttiva dei rotiferi;
  - maggior igiene: il "tutto pieno-tutto vuoto" insieme alla disinfezione delle vasche tra un ciclo e l'altro garantisce un buon livello igienico dell'alimento vivo.
- Sistema in semicontinuo. Dopo il lancio dell'allevamento, si preleva quotidianamente la dose di organismi per l'alimentazione larvale. Dopo un certo numero di raccolte, si rinnova completamente la vasca. Le vasche di allevamento vengono riempite fino a metà della loro capienza e, nel corso dei primi due - tre giorni, si aumenta il volume dell'acqua fino al riempimento della vasca. Nei giorni successivi si preleva una quantità di acqua pari a circa la metà del volume totale della vasca per utilizzare i rotiferi raccolti come alimento; la vasca viene, quindi, nuovamente riempita con acqua il che consente di dimezzare la densità dei rotiferi rimasti. Al sesto-settimo giorno il contenuto della vasca viene raccolto completamente. Il rinnovo dello stock diviene necessario perché, dopo alcune raccolte, il tasso riproduttivo dei rotiferi tende a diminuire probabilmente a causa dell'accumulo di rifiuti organici e di cibo non utilizzato.
- Sistema in continuo. Raggiunta la densità costante di rotiferi, si preleva periodicamente una certa quantità di organismi senza mai svuotare completamente le vasche. Una volta a regime, la popolazione di rotiferi tendenzialmente raddoppia ogni giorno. Di conseguenza metà dello stock viene raccolto quotidianamente e si ripristina il volume della vasca aggiungendo nuova acqua. La quantità di rotiferi prodotta in questo sistema di allevamento è nettamente più alta che nei sistemi convenzionali. Questo metodo, però, ha lo svantaggio di non essere conveniente a lungo termine in quanto provoca uno scadimento qualitativo del rotifero e fa aumentare il rischio di crash produttivi.

Il *Brachionus* così coltivato viene offerto alle larve fino al 15° giorno di vita, benché già dopo il 10° giorno è necessario offrire un'ulteriore tipologia di alimento vivo di maggiori dimensioni come i naupli di *Artemia salina*, per poi passare alla somministrazione di metanaupli di artemia dopo il 15° giorno di vita.

## Capitolo 2

### 2 Stato dell'arte

#### 2.1 Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili

##### 2.1.1 Importanza e ruolo delle fitocolture nell'acquacoltura responsabile

Purtroppo la maggior parte degli allevamenti a circuito chiuso scaricano nitrati e fanghi organici nell'ambiente (van Rijn, 1996). Ogni alterazione degli equilibri tra i nutrienti (ad esempio un eccessivo apporto di nitrati o fosfati) comporta uno squilibrio nella crescita del fitoplancton, che si manifesta con un'esplosione numerica di determinate specie (*fioriture algali o maree rosse*) e comporta notevoli conseguenze negative sull'intero ecosistema acquatico, con estese morie di organismi (crisi distrofiche) (Trotta, 2001).

Mentre le tecnologie di filtrazione batterica sono pronte per relativamente piccole colture intensive di organismi produttivi (Zucker e Anderson, 1999), non ci sono informazioni disponibili su come tali tecnologie possono integrate su larga scala le produzioni a basso costo di pesci e l'allevamento semintensivo di gamberi negli stagni.

La possibilità di trasformare biologicamente l'azoto nitrico ha delle implicazioni importantissime. Le sostanze nutritive dei reflui sono considerate nell'acquacoltura integrata non un onere ma una risorsa per le colture ausiliari di piante (Chamberlaine e Rosenthal, 1995).

La biofiltrazione mediante vegetali (*fig.2.1*), come le macroalghe, è assimilativa, e quindi aumenta la capacità di assimilazione dell'ambiente per i nutrienti (Krom, 1986). I biofiltri vegetali possono dunque ridurre notevolmente l'impatto ambientale globale delle colture.

L'impiego di macroalghe come utilizzatori di nutrienti nell'acquacoltura integrata si è dimostrata un'eccellente esempio di ecotecnologia (Neori et al., 2004), nella quale il sistema di produzione è disegnato in collaborazione con la natura (Mitsch e Jørgensen, 1989). Specie del genere *Ulva* sono di solito scelte per l'elevata efficienza di produzione di biomassa e biofiltrazione (Neori et al., 1996). *Gracilaria* spp. e *Gracilariopsis* spp. possono anch'esse contribuire a un'efficiente rimozione di P e N disciolti nei reflui di allevamenti intensivi (Buschmann et al., 1996; Alcantara et al., 1999; et al., 2001).

Rao e Hall (1987) riportarono che le microalghe possono fornire una soluzione per prevenire l'eutrofizzazione dei corpi idrici. Vilchez et al. (1997) confermarono che anche le microalghe possono essere impiegate per l'eliminazione di inquinanti azotati, fosforici e sulfurei. De la Noue e Prouix (1986) hanno dimostrato in studi preliminari che il passaggio dell'acqua trattata

secondariamente attraverso *Phormidium laminosum* fissata su supporti di chitosano rimuoveva il 98% di N e il 60% di P in 24 h. De Pauw et al. (1978) utilizzarono le microalghe immobilizzate per il trattamento dei reflui con risultati promettenti. Microalghe su supporti alginati furono impiegati per il trattamento dei liquami da Sanchez et al (1991).

Attualmente le microalghe sono diventate oggetto di un crescente interesse per la notevole potenzialità di sfruttamento loro riconosciuta. Esse sono impiegate con successo in numerosi settori: acquacoltura, industria chimica, bioenergetica, cosmetica. Importanti applicazioni anche nel campo alimentare e farmaceutico (possedendo sostanze con proprietà antibatteriche, antivirali ed antitumorali). Le biomasse microalgali contengono importanti principi nutritivi (proteine, grassi, carboidrati, carotenoidi, vitamine) sfruttati anche dall'industria alimentare. Gli acidi grassi polinsaturi  $\omega 3$  sono tra i prodotti di maggiore interesse commerciale (Ratledge, 2002), specialmente DHA ed EPA sono importanti nella prevenzione di alcune malattie (cardiovascolari, livelli elevati di colesterolo e diversi carcinomi) (Carvalho and Malcata, 2005). Un altro promettente campo di applicazione è la produzione di carotenoidi per usi industriali, cosmetici ed acquacolturali (Del Campo et al., 2004).

Nel nostro paese l'interesse verso le colture di microalghe marine è relativamente recente ed è scaturito proprio dall'idea di utilizzare tali colture quale punto di partenza per ricostruire la catena trofica nei processi di riproduzione artificiale di specie ittiche marine (*fig. 2.2*).

Il Fitoplancton viene comunemente usato come alimento vivo per organismi filtratori quali i *Molluschi Bivalvi*, le larve di *Peneidi*, o da "pabulum" per Zooplancton quali *Copepodi* e *Rotiferi*, che a loro volta costituiscono cibo per larve di molte specie di pesci e crostacei ad oggi allevate.

La fitoplanctoncoltura (*fig. 2.3*), paragonabile all'attuale agricoltura, richiede la "domesticazione" delle specie vegetali utili e la formazione di ambienti di coltura particolarmente adatti alle esigenze fisiologiche della produzione algale massiva (Trotta, 2001)

Nell'affrontare il problema dell'alimentazione degli organismi acquatici allevati occorre operare una distinzione tra le fasi iniziali e quelle successive del loro ciclo vitale.

Nonostante i recenti tentativi di sostituire l'alimento vivo con diete artificiali o di anticipare la somministrazione di quest'ultime limitando l'alimento vivo ai primissimi stadi di vita degli organismi allevati (al fine di diminuire o eliminare costi e tempi di produzione dello stesso), il Plancton risulta ancora fondamentale nelle fasi iniziali di allevamento di molti Pesci, Crostacei e Molluschi Bivalvi al fine di garantirne un adeguato sviluppo.

Per soddisfare le particolari esigenze nutritive di larve ed avannotti si allevano diverse specie *fitoplanctoniche* e *zooplanctoniche* riproducendo in scala la catena alimentare presente in natura.

Alcune specie ittiche, come ad esempio le Trote e le Carpe, producono uova di grandi dimensioni e

quindi, dopo il riassorbimento del sacco vitellino, le larve sono già in grado di accettare mangime secco.

Tuttavia per altre specie che producono uova di ridotte dimensioni e larve conseguentemente piccole e con dimensioni della bocca ridotta (oltre ad una limitata capacità di riconoscere l'alimento inerte che non stimola l'istinto predatorio a causa della sua immobilità), il *fitoplancton* è utilizzato:

- direttamente come alimento (ad *es.* per le *Tilapie* che avendo un regime alimentare polivalente, oltre a predare piccoli animali dal sedimento, filtrano il *plancton* direttamente dall'acqua),
- per la produzione e l'arricchimento delle proprietà nutrizionali dello *zooplancton* (per lo più *rotiferi*) somministrato a sua volta alle larve di pesci.

Il *fitoplancton* è inoltre somministrato agli stadi larvali e giovanili dei Molluschi Bivalvi (ostriche, mitili e vongole) ed alle larve di gamberi (*Penaeus sp.* e *Metapenaeus sp.*) le quali, in stadi larvali più avanzati (*Mysis*), sono alimentate con naupli di *Artemia salina*.

La produzione del *fitoplancton* rimane quindi un aspetto critico importante per il successo degli allevamenti, soprattutto nel caso dei Molluschi Bivalvi dove, per soddisfare il fabbisogno alimentare degli organismi allevati, devono essere prodotte quotidianamente grandi quantità di microalghe.

Ciò comporta la necessità da parte di avannotterie e schiuditori di avere un reparto apposito per la produzione di plancton, i cui protocolli di allevamento sono ormai piuttosto consolidate.

Le colture intensive di *fitoplancton* sono necessarie in quanto la sua presenza nei mari non è sufficiente a sostenere una crescita ottimale di larve e stadi giovanili allevati ad alta densità. Nell'allevamento larvale in particolare, i trattamenti cui viene sottoposta l'acqua eliminano quasi completamente il *fitoplancton*, che deve quindi essere sostituito tramite colture delle specie fitoplanctoniche ad alto valore nutritivo.

## **2.1.2 Le produzioni fitoplanctoniche nei sistemi intensivi a circuito chiuso**

### **2.1.2.1 Criteri di selezione dei ceppi algali**

La scelta delle specie da allevare dipende dallo scopo e altri fattori quali:

1. *dimensioni* (adeguate alla filtrazione o all'ingestione delle specie utilizzatrici);
2. *nutrienti* (*proteine, carboidrati, lipidi* e in particolare gli *acidi grassi polinsaturi  $\omega 3$* );
3. *ritmo di riproduzione e tassi di crescita rapidi* ( *tab. 2.1* );
4. *grado di tolleranza* rispetto a fluttuazioni di temperatura, luce e nutrienti (che possono presentarsi in coltura);



5. *assenza di tossine* (che possono essere trasferite alla catena alimentare);
6. *resistenza a protozoi predatori*.

Tutte queste caratteristiche devono tuttavia essere compatibili con le necessità tecnico-economiche dell'impianto.

Tra gli aspetti più importanti vi sono le *caratteristiche nutrizionali*. Il contenuto algale in *proteine e lipidi* ha più importanza per la crescita delle larve di *Molluschi Bivalvi* ed *avannotti* (veicolati in tal caso dai *Rotiferi*) rispetto a quello in *carboidrati* che, soprattutto nei *Molluschi Bivalvi*, non risulta essere un fattore così determinante, almeno per quanto riguarda gli individui adulti (Brown, 2003).

Ciò non significa ovviamente che i contenuti di *carboidrati* e *vitamine* non siano altrettanto importanti per un adeguato valore nutrizionale delle alghe, tuttavia il parametro più importante rimane il contenuto lipidico.

La composizione in acidi grassi è specie specifica ma è anche legata all'età della coltura algale, alle condizioni di allevamento (temperatura, illuminazione, nutrienti, *ecc.*) ed alla fase di raccolta (Impiccini *et al.*, 1996).

In particolare, le microalghe marine sono di rilevante interesse per la loro capacità di sintetizzare: *acido docosoesanoico* (DHA), *acido eicosopentanoico* (EPA) e *acido arachidonico* (ARA) (Brown, 2003). Questi tre acidi, ad alto valore nutritivo, vengono accumulati soprattutto nelle membrane delle cellule del sistema immunitario, la cui composizione e funzione sono fortemente influenzate dalla loro presenza (Delaporte *et al.*, 2003). Molte specie di microalghe hanno moderata percentuale di EPA come ad esempio l'*Isochrysis galbana* che risulta però ricca di DHA, mentre per altre accade esattamente l'opposto, ad es. la *Thalassiosira sp.* è ricca in EPA e povera in DHA.

Per tale motivo spesso vengono utilizzate diete multi-specifiche che consentono di non avere carenze sulla composizione dei *lipidi*.

#### **2.1.2.2 Le differenti destinazioni delle microalghe utilizzate come 'mangime vivo' in acquacoltura**

Dato che le microalghe (*Flagellate* e *Diatomee*) sono i prodotti primari alla base della dieta dei *Molluschi Bivalvi*, uno dei più comuni utilizzi delle alghe marine monocellulari è l'alimentazione di questi organismi all'interno degli schiuditoi.

A tale scopo sono combinate, in miscele più o meno diversificate, alghe di *piccole dimensioni* ma con elevato valore nutritivo al fine di fornire ai *Molluschi* un alimento il più completo possibile.

Dal momento che molte specie di *Bivalvi* marini presentano una limitata capacità di sintetizzare trigliceridi, steroli liberi, digliceridi e altri lipidi di membrana, è necessario fornire questi acidi grassi con la dieta per favorire migliori tassi di accrescimento e sopravvivenza larvale. Per tale motivo *Isochrysis sp.* (ricchi di DHA) è la specie più comunemente usata come alimento per le

larve nei primi stadi giovanili di *Molluschi Bivalvi*. Solitamente si usa la flagellata *Isochrysis galbana* e la sua varietà *Isochrysis thaiti*, meglio conosciuta come *T-ISO* (la quale si distingue proprio dalla *I. galbana* per il suo alto valore nutritivo) e la diatomea *Thalassiosira pseudonana* e *T. weissflogii*.

*Isochrysis galbana* essendo più piccola (2-4 µm) viene utilizzata nei primi giorni di allevamento (primi 3-4 giorni). Successivamente alla dieta larvale viene aggiunta *Thalassiosira pseudonana*, le cui dimensioni sono leggermente più grandi (12 µm). *Thalassiosira weissflogii*, così come la *T. pseudonana*, funziona molto bene con *ostriche*, *mitili* e piccoli *pettini*; *T. weissflogii* risulta tuttavia di maggiori dimensioni rispetto a *T. pseudonana*.

Inoltre trovano applicazione altre specie quali:

- *Nannochloropsis oculata* (efficace coi *mitili*);
- *Tetraselmis suecica* (alimento standard per *ostriche*, *mitili* e *pettini*);
- *Skeletonema costatum*;
- *Phaeodactylum tricornerutum*
- *Pavlova sp.* (usata principalmente come arricchitore).

In acquacoltura un altro utilizzo comune delle alghe è l'alimentazione dei *Crostacei*.

A tale scopo sono per lo più utilizzate: *Tetraselmis suecica* (eccellente per incrementare la percentuale produttiva e combattere la “*Sindrome di Zoea*”), *Isochrysis sp.* (importante come arricchitore del DHA soprattutto nei *Gamberi*), *Pavlova sp.* (altro arricchitore di DHA), *Thalassiosira weissflogii* (usata dalla fase di *Mysis* fino a quella di *Post-larva*), *Chaetoceros sp.* e *T. pseudonana* (usate in particolare per le larve di *Peneidi*). Il nauplio dei *Peneidi* infatti, dopo un primo stadio larvale planctonico, durante il quale si accresce a spese delle riserve energetiche accumulate nel sacco del tuorlo, attraversa 6 substadi e metamorfosa, dopo 36 ore, a *zoea*. Questa seconda forma larvale, planctonica, viene alimentata con Diatomee come *Chaetoceros sp.* e permane tale per tre giorni, attraversando 3 substadi, per metamorfosare poi a *Mysis*.

In altri casi il *fitoplancton* è usato principalmente per arricchire *artemia* e *zooplancton*: *Copepodi* ed in particolare i *Rotiferi* (di cui parleremo più avanti), utilizzati a loro volta nell'alimentazione di larve ed avannotti di molti pesci all'interno delle 'avannotterie'. Gli acidi grassi polinsaturi necessari all'accrescimento di tali stadi, sono così forniti dalle alghe e veicolati dallo *zooplancton*. I più importanti per un corretto sviluppo delle piccole larve sono quelli della serie ω3 ed ω6. Ricca di tali acidi grassi è *Nannochloropsis oculata*, che risulta essere il miglior alimento singolo per i *Rotiferi*, anche se è tuttavia spesso utilizzata insieme a *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis sp.* (ottima anche per *Artemia*) o *Pavlova sp.* (ottima per l'arricchimento grazie all'alto contenuto di EPA e DHA). *Thalassiosira weissflogii* e *T. pseudonana* invece sono usate più comunemente per i

### *Copepodi.*

Le alghe unicellulari vengono utilizzate all'interno degli allevamenti anche per altri scopi: ad *es.* per l'alimentazione degli stock di riproduttori di molluschi bivalvi durante la fase di condizionamento che li porterà a maturare le gonadi e per l'allevamento delle larve e degli stadi giovanili di alcune specie ittiche, durante il preingrasso. A tal scopo le specie maggiormente utilizzate sono: *Chaetoceros sp.*, *Isochrysis sp.*, *Thalassiosira sp.* e in particolare *Pavlova sp.* (molto utile per innalzare i tenori di EPA e DHA).

Vi sono poi altri utilizzi meno comuni

- *Nannochloropsis oculata* viene usata in vasche di barriera corallina per nutrire coralli ed altri animali filtratori;
- *Isochrysis sp.* è utilizzata nell'allevamento del Rombo chiodato (*Psetta maxima*) per imbrunire l'acqua limitando così la penetrazione della luce e riproducendo di fatto gli strati profondi (non utilizzarla non inficia sull'accrescimento del Rombo, tuttavia esso non svilupperà la tipica pigmentazione chiodato-marrone e rimanendo biancastro risulterà poco apprezzato dal mercato);
- Infine, molte alghe sono usate nella tecnica delle *acque verdi*, ovvero l'aggiunta delle colture algali nella vasca di allevamento larvale, come ad *es.* *Nannochloropsis oculata*.

In alcuni casi, in sostituzione o come supplemento alle alghe prodotte con i metodi tradizionali o in caso di "crash" della coltura algale possono essere utilizzate *alghe pronte concentrate*, prodotte da diverse ditte in confezioni pronte all'uso per fornire un alimento diretto con buoni risultati, ad un costo ragionevole. Tali alghe possono essere inoltre conservate facilmente tramite congelamento.

Fra le innumerevoli specie utilizzate in acquacoltura, le più diffuse possono essere suddivise in alcuni gruppi, quali: *Prasinoficee*, *Chlorophyceae*, *Eustigmatophyceae*, *Haptophyceae* e le *Diatomee* (*fig. 2.4*).

In pratica le microalghe maggiormente coltivate come fonte alimentare (*tab. 2.2*) per gli organismi acquatici sono *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, (*fig. 2.5*) utilizzate per tale motivo anche nelle nostre sperimentazioni.

### **2.1.3 Trattamento di sterilizzazione**

Tra i sistemi finalizzati alla sterilizzazione dell'acqua, ovvero all'uccisione della maggior parte dei microrganismi che vivono e si moltiplicano negli ambienti di allevamento, i più diffusi sono rappresentati dal trattamento chimico e/o fisico.

Il metodo di disinfezione usato deve tener conto di numerosi criteri:

1. Non alterare le proprietà chimico-fisiche dell'acqua.
2. Le sostanze chimiche o i prodotti secondari non devono essere pericolosi per pesci o altri

organismi acquatici. Il trattamento non deve arrecare danni ai biofiltri in un sistema a ricircolo.

3. Tutte le apparecchiature devono essere applicabili con il minimo uso di energia elettrica o con l'uso di altre forme di energia.
4. Efficace per eliminare gli organismi patogeni che sono fonte di preoccupazione in una situazione particolare.

La disinfezione dell'acqua di allevamento utilizzata è un mezzo efficace di lotta contro la malattia in situazioni di cultura di pesce (Burrows e Combs 1968; Conrad et al. 1975; Bullock e Stuckey 1977). La Disinfezione può ridurre l'incidenza di trasmissione delle malattie tra le unità se l'acqua deve essere riutilizzata (Conrad et al. 1975; Bullock e Stuckey 1977). Se l'acqua viene riutilizzato all'interno della stessa unità, la disinfezione può contribuire a ridurre il numero di agenti patogeni presenti nel sistema. Inoltre la disinfezione può anche essere usato per prevenire la diffusione di agenti patogeni negli effluenti.

#### **U.V.**

La radiazione UV (raggi ultravioletti), energia luminosa a cortissima lunghezza d'onda, è una delle radiazioni non percepibili dal nostro occhio ed è generata da speciali lampade che solitamente utilizzano bande di luce a lunghezze d'onda poste nell'intervallo da 315 a 400 nm (UV-A) e da 100-280 nm (UV-C). Le lampade UV al mercurio a bassa pressione, utilizzate per la disinfezione dell'acqua utilizzano prevalentemente radiazioni UV-C di circa 254 nanometri, che si avvicina al valore di massima efficacia (265 nm). Si tratta di radiazione ultravioletta particolarmente ricca di energia con funzione "germicida" nei confronti di tutti i microrganismi (Virus, Batteri, Alghe, Spore, Muffe) presenti nell'acqua.

Il trattamento è di tipo fisico poiché la radiazione venendo a contatto con i microrganismi, penetra la parete cellulare di questi ultimi e ne attacca il nucleo, danneggiando irreparabilmente il codice genetico (DNA o RNA), tramite la rottura dei legami insaturi, inibendo così la proliferazione dei microrganismi ed eliminandone la presenza. Le purine e le pirimidine sembrano essere i bersagli principali dell'azione dei raggi UV.

I raggi UV sono efficaci purché l'acqua sia sufficientemente limpida da permettere il passaggio della radiazione e il suo assorbimento da parte dei microrganismi in sospensione. Il prolungamento dell'esposizione dell'acqua ai raggi ultravioletti è necessario per ottenere un totale abbattimento dei microrganismi.

In pratica, l'acqua entra nella camera di disinfezione in acciaio-inox dove, protette da uno speciale involucro di quarzo, sono alloggiato le lampade contenenti vapori di mercurio a bassa pressione che irradiano raggi ultravioletti ad alta intensità e lunghezza d'onda costante e controllata. Una volta

entrata, l'acqua subisce istantaneamente l'irradiazione degli ultravioletti. Tale irradiazione viene prolungata dalla particolare conformazione del circuito idraulico attraverso il quale l'acqua scorre.

Il trattamento è molto veloce anche se talvolta un unico passaggio a velocità eccessive può non essere efficace per la distruzione di tutti i Batteri motivo per cui nel nostro caso l'acqua è fatta ricircolare in continuo attraverso l'UV.

Il dosaggio per inattivare un microrganismo dipende da vari fattori quali:

- ⇒ La taglia dell'organismo: più è grande, tanto meglio il suo DNA è protetto per cui la dose deve aumentare;
- ⇒ La velocità del flusso: a parità di dose UV ricevuta, è più sterile l'acqua che passa lentamente attraverso l'apparecchio, quindi il tempo di esposizione;
- ⇒ La temperatura dell'acqua: basse temperature ne possono ridurre la potenza (massima potenza UV a 43°C);
- ⇒ La trasmittanza del liquido: fluidi più limpidi sono meglio sterilizzati (ad es. l'acqua distillata ha una trasmittanza del 99%, l'acqua filtrata 95%, l'acqua di rubinetto 90%, l'acqua marina 85-90%).

L'UV prevede dei limiti; sia per quanto riguarda i solidi sospesi totali, che devono essere inferiori a 20 g/l in modo da non avere il fenomeno dello 'scattering' (deviazione delle radiazioni provocata da particelle sospese).

Se la quantità di energia non è sufficiente, il materiale genetico degli organismi è solamente danneggiato, per cui è buona norma sovradosare l'energia necessaria per ottenere la disinfezione (come nel nostro caso).

Infatti non utilizzando sostanze chimiche ossidanti pericolose spesso difficili da dosare (come ozono, cloro, ecc.), non si producono residui tossici e sottoprodotti pericolosi ed il sovradosaggio non comporta rischi.

Dal punto di vista costruttivo gli apparecchi utilizzati in acquacoltura possono essere di tipo sospeso o di tipo sommerso. I sistemi sospesi consistono in una batteria di lampade e di riflettori parabolici appesi all'altezza di 10-20 cm dalla superficie di un flusso d'acqua laminare, passante sopra una superficie piana costituita generalmente da un truogolo metallico lucidato a specchio; questo può essere provvisto di deflettori ovvero di lamine verticali trasversali, che hanno la funzione di garantire l'omogeneità del flusso lungo tutta la sezione trasversale.

Il numero delle lampade, l'altezza d'installazione e il loro interasse devono essere opportunamente dimensionati per garantire l'invio di tutta la radiazione emessa verso il flusso d'acqua. Il sistema sospeso può essere adottato anche in canali di tipo aperto per il trattamento di elevati flussi d'acqua (es. fino a 2000 m<sup>3</sup>/h); in questo caso, si tratta d'installare una batteria di lampade UV, protette da

tubi di quarzo, disposte trasversalmente sopra un canale preesistente. Anche in questo caso, monitorando la portata del flusso e la trasmittanza dei raggi UV, è possibile regolare il dosaggio della radiazione e, quindi, i consumi in funzione delle effettive esigenze operative.

I sistemi sommersi possono essere di tipo longitudinale o di tipo trasversale. Quelli di tipo longitudinale sono costituiti da una camera cilindrica, detta di irradiazione, dentro la quale sono inseriti longitudinalmente più tubi in quarzo al cui interno sono installate le lampade U.V.. L'acqua, scorrendo lungo i tubi di quarzo, è esposta ai raggi U.V. per il tempo necessario a somministrare la dose germicida ottimale.

Questi apparecchi, essendo in grado di trattare flussi d'acqua costanti con portate medio basse (es. da 5 fino a 100 m<sup>3</sup>/h), sono adatti ad installazioni in sistemi di allevamento di tipo chiuso. I sistemi sommersi di tipo trasversale sono detti a canale a "U", in quanto sono costituiti da una camera d'irradiazione a forma di U, entro cui l'acqua scorre da un'estremità all'altra ove viene scaricata.

Lungo il percorso l'acqua incontra, una dopo l'altra, un elevato numero di lampade disposte in senso trasversale. Con gli apparecchi di questo tipo è possibile regolare automaticamente l'accensione del numero di lampade richieste in funzione della portata e della trasmittanza, permettendo un efficiente trattamento di flussi con portate variabili di media o alta entità (es. da 50 a 400 m<sup>3</sup>/h). Le lampade devono essere mantenute sempre pulite sia nei sistemi sospesi, sia in quelli sommersi. Normalmente, i sistemi sommersi sono provvisti di dispositivi automatici per la rimozione delle particelle che aderiscono sulla superficie dei tubi di quarzo.

Spotte (1979) raccomandava una radiazione U.V. di 35.100 mWsec/cm<sup>2</sup> per la disinfezione nei sistemi a ricircolo. Comunque, 13.100 mWsec/cm<sup>2</sup> può essere sufficiente per un controllo dei batteri patogeni. Nel caso dei Protozoi parassiti, per un controllo efficace occorrono 90.000-1.700.000 mWsec/cm<sup>2</sup> (Vlasenko 1969).

Sistemi ultravioletti richiedono regolare pulizia delle lampade e sostituzione delle stesse periodicamente.

Quando le lampade a raggi ultravioletti sono sospese direttamente sull'acqua, parte dell'efficienza di ossidazione generata dall'irraggiamento ultravioletto deriva proprio dalla produzione di ozono a livello dell'interfaccia aria-acqua (Bean, 1959).

Nell'allevamento del salmone è stata riscontrata una riduzione sostanziale delle patologie dopo il trattamento dell'acqua con l'irraggiamento UV; il processo risultava avere distrutto organismi di diametro inferiore a 15 µm, tra cui batteri, protozoi e virus (Burrows et Combs, 1968).

La radiazione più efficace risulta essere quella di lunghezza d'onda compresa tra 250 e 260 nm.

Una volta stabilito il microrganismo da eliminare e il grado o percentuale di sterilizzazione che si vuole ottenere, è possibile determinare il dosaggio richiesto. Questo dosaggio può essere espresso in

$\text{mJ}/\text{cm}^2$ , in  $\text{mWs}/\text{cm}^2$  o in  $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ . Il tempo di esposizione ai raggi UV può essere dosato variando il flusso d'acqua trattato in funzione del tipo di microrganismi che si intende eliminare. Oltre al tipo di microrganismo da eliminare, altri fattori devono essere considerati per valutare l'efficienza della radiazione U.V.. La temperatura e il pH non sembrano influire direttamente sull'effetto germicida dei raggi U.V., mentre l'intensità della radiazione e il tempo di esposizione risultano essere i fattori più importanti. Se l'acqua è pura l'assorbimento della radiazione da parte di questa è praticamente trascurabile, assicurando in tal modo la massima efficienza germicida. L'intensità dei raggi U.V. dovrebbe essere dosata in funzione della concentrazione di particolato e di sostanze disciolte che possono ridurre la trasmittanza della radiazione, limitando l'efficienza del trattamento. Per questo motivo è opportuno prevedere sempre l'installazione a monte di un sistema di filtrazione meccanica (Liltved e Cripps, 1999). Tuttavia, a questo tipo di filtrazione sfuggono alcune sostanze solubili, come gli zuccheri, l'ammoniaca e altri composti azotati, che riducono in modo consistente la trasmittanza nell'acqua dei raggi U.V..

Diversamente da altri sistemi di sterilizzazione, i raggi U.V. presentano il grande vantaggio di non comportare alcuna aggiunta di composti chimici che possono modificare le proprietà fisiche e chimiche dell'acqua. Inoltre, la sovraesposizione ai raggi U.V. non provoca effetti negativi. Sul mercato sono presenti lampade a vapori di mercurio che possono essere a bassa o ad alta pressione. I vapori di mercurio, sottoposti a scarica elettrica, generano energia luminosa con lunghezza d'onda di 254 nm. Le lampade a bassa pressione presentano un rendimento in raggi UV pari al 30% dell'energia assorbita, mentre quelle ad alta pressione hanno un rendimento assai inferiore, pari al 8%.

### ***Ozono***

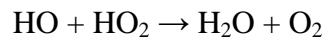
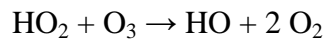
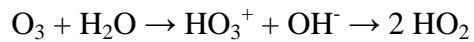
L'ozono ( $\text{O}_3$ ), forma allotropa dell'ossigeno, è un gas di colore blu con caratteristico odore pungente, dotato di forte potere ossidante; è utilizzato da oltre settant'anni, soprattutto in Europa, come disinfettante, decolorante e deodorante.

Nei sistemi di allevamento di tipo chiuso l'impiego di ozono permette di ridurre il numero di microrganismi e il tenore di sostanza organica in soluzione ma, per garantirne l'efficienza, è necessario prevedere a monte un adeguato sistema di filtrazione meccanica.

L'ozono distrugge i microrganismi agendo come ossidante protoplasmatico (Fetner et Ingols, 1959); le quantità necessarie per ottenere la sterilità dell'acqua sono documentate in modo abbastanza preciso. Per esempio, una dose 1,5 ppm di  $\text{O}_3$  è in grado di ridurre in 5 minuti i batteri in sospensione da 70.000 per ml a 0 (Dickerman et al., 1954).

La solubilità in acqua dell'ozono è superiore a quella dell'ossigeno biatomico e inferiore a quella del cloro; alla temperatura di  $20^\circ\text{C}$  la concentrazione di saturazione è di circa 570 mg/l. L'ozono

reagisce nell'acqua nei modi seguenti:



I radicali liberi,  $\text{HO}_2$  e  $\text{HO}$ , sono forti ossidanti e presentano il vantaggio di essere rapidamente convertiti in ossigeno. Il ritmo con cui l'ozono degrada a ossigeno biatomico aumenta al crescere della temperatura. Essendo molto instabile, l'ozono non può essere stoccato o trasportato; perciò è prodotto direttamente in loco al momento del suo utilizzo. I generatori di ozono impiegano ossigeno o aria disidratata inducendoli a passare attraverso una corona ad alta tensione (es. da 4.000 a 30.000 V); utilizzando ossigeno puro, invece che aria, è possibile raddoppiare il quantitativo di ozono prodotto.

L'ozono è particolarmente efficiente per l'ossidazione dell'ammoniaca e della sostanza organica; inoltre, determina la conversione dei solfiti e dei solfuri in solfati, dei nitriti in nitrati, dei cloruri in cloro e degli ioni ferro e manganese nelle loro forme ioniche insolubili, dando origine ai relativi precipitati.

L'ozono non è efficace nell'ossidazione dei composti saturi; inoltre, sulla sua efficienza di ossidazione influiscono diversi fattori tra cui, principalmente, la temperatura e il pH. Quando i valori di questi fattori aumentano l'ozono diventa più instabile. Come per altre tecniche di filtrazione chimica, il tempo di contatto ha particolare importanza.

L'ozono è instabile nell'acqua e, quindi, il tempo di contatto è più critico della quantità impiegata.

L'ozono è corrosivo e pericoloso; essendo tossico, non deve mai essere fatto gorgogliare liberamente negli ambienti di allevamento. Per ragioni di sicurezza, dovrebbe essere iniettato nella colonna in modo tale da potersi dissipare lontano dagli organismi allevati.

L'ozono è stato utilizzato anche per rimuovere il manganese in soluzione (Bean, 1959); quindi, è ragionevole pensare che l'ozonizzazione prolungata possa privare l'acqua di questo e, forse, di altri elementi. Per questo motivo, negli impianti operanti con acqua di mare, dotati di ozonizzatore, è consigliabile ricorrere ogni due settimane a ricambi parziali del 10% del volume di acqua per evitare il possibile esaurimento di alcuni microelementi.

Una considerazione importante con l'ozonizzazione è l'inefficienza energetica degli attuali generatori di ozono (Spotte 1979). Pertanto, ozonizzazione non è un metodo pratico di disinfezione per i grandi volumi di acqua.

### **Cloro**

Il cloro è di colore giallo verdognolo e presenta un forte odore caratteristico; generalmente, è commercializzato sottoforma di gas liquefatto sotto pressione oppure in forma liquida, come

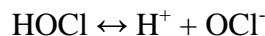


ipoclorito di sodio (NaOCl), o in polvere come ipoclorito di calcio (Ca(OCl)<sub>2</sub>). Il gas si miscela facilmente nell'acqua formando alla temperatura di 20°C una soluzione allo 0,7%. Come altri elementi alogeni (es. fluoro, bromo, iodio) anche il cloro è un potente battericida grazie all'azione fortemente ossidante.

Si tratta solitamente di soluzioni al 3-5% di ipoclorito di sodio (cloro attivo) in acqua. Il cloro è largamente utilizzato per la disinfezione e il trattamento dell'acqua; è prodotto industrialmente per elettrolisi del cloruro di sodio.

I composti cloroattivi, in soluzione acquosa, danno origine a cloro elementare (Cl), ad acido ipocloroso ( $\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$ ), dotato di un elevato potere ossidante ed in grado di danneggiare le cellule microbiche, ed a ione ipocloroso (OCl<sup>-</sup>); questi ultimi due originano l'uno dall'altro in funzione del pH della soluzione. A pH acido si origina acido ipocloroso con attività germicida più elevata, a pH alcalino si forma prevalentemente ione ipocloroso la cui attività disinfettante è meno marcata (1:80); il massimo di attività dell'acido ipocloroso si ottiene a pH intorno a 5, che consente solo una dissociazione ionica minima mentre diminuisce a pH superiore. Il potere disinfettante di tutti i composti che liberano cloro viene espresso come "cloro disponibile".

L'acido ipocloroso, essendo debolmente acido, va incontro alla parziale dissociazione.



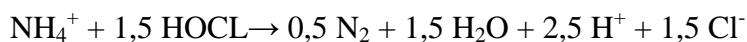
Il cloro agisce attivamente come agente ossidante sotto forma di acido ipocloroso e di ione ipoclorito. Come per ogni altro trattamento di disinfezione per ossidazione, anche in questo caso è necessario prevedere a monte un idoneo sistema di filtrazione meccanica.

Il meccanismo esatto con cui il cloro uccide i microrganismi non è del tutto noto; si ritiene che il cloro penetri all'interno della cellula e reagisca con alcuni enzimi. Questa ipotesi si basa sul fatto che il cloro, reagendo con i composti azotati, reagisca anche con le proteine e quindi con gli enzimi. Il cloro penetrato all'interno della cellula reagisce con il protoplasma formando composti N- cloro (clorammine) che si accumulano con effetti letali, nel tempo, per la cellula microbica. Ovviamente si hanno anche gravi danni nei meccanismi di trasporto delle sostanze nutritive all'interno della cellula. A concentrazioni più elevate, in virtù della spiccata capacità ossidativa del cloro (soprattutto del Cl<sub>2</sub> e del HOCl) ed a pH pari circa a 5 (a valori inferiori si formerebbe cloro gassoso, molto meno attivo), si ha la denaturazione o coagulazione delle proteine strutturali ed enzimatiche della cellula microbica, nonché la denaturazione dei gruppi -SH degli enzimi.

Altri fattori, singoli o associati, condizionano le attività antimicrobiche del cloro: come concentrazione, temperatura, materiale organico, ecc.. Le sostanze organiche "consumano" il cloro disponibile e ne riducono l'efficacia; i lipidi, soprattutto gli acidi grassi polinsaturi, incorporano cloro in valori ancora più marcati; le proteine integrano il cloro nella loro molecola formando N-

cloro composti (clorammine).

Le clorammine hanno anch'esse azione disinfettante. La quantità di clorammine nell'acqua è detta cloro combinato disponibile. Le clorammine reagiscono più lentamente, rispetto al cloro libero, ma sono più efficaci quando il pH presenta valori elevati. Le modalità di azione possono essere chiarite attraverso la reazione detta di "break-point" che si verifica quando il cloro è aggiunto in quantità sufficiente per causare l'ossidazione dell'ammoniaca in azoto biatomico (N<sub>2</sub>):



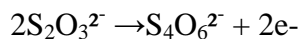
Tuttavia il cloro non riesce ad essere altrettanto attivo contro i Virus, questi infatti sono costituiti da materiale genetico circondato da una struttura proteica detta 'capside' che il cloro non riesce a danneggiare.

La concentrazione di acido ipocloroso e di ione ipoclorito non combinati è detta cloro libero residuo.

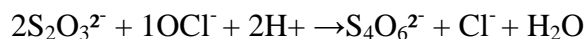
L'acqua clorata non può essere immessa direttamente negli ambienti di allevamento in quanto è tossica per gli animali acquatici anche a basse concentrazioni; il massimo quantitativo di cloro residuo ammissibile per consentire la vita acquatica risulta essere di 0,06 mg/l. Quindi il cloro deve essere rimosso dopo il trattamento di clorazione con l'aggiunta del tiosolfato di sodio al 12,5% (12,5 g di tiosolfato in 100 ml di acqua) in quantità uguale o generalmente doppia alla candeggina (per inattivare gli ipocloriti sono sufficienti anche soluzioni a concentrazioni inferiori del 3-5%, purché se ne aumenti la quantità). Il tiosolfato garantisce la neutralizzazione della candeggina residua evitando che l'eventuale cloro libero, ancora presente nell'acqua, continui la sua azione battericida.

A temperatura ambiente si presenta come un solido incolore ed inodore. Il tiosolfato di sodio (pentaidrato) è il sale di sodio dell'acido tiosolforico ed ha una formula molecolare pari a: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O.

Lo ione tiosolfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) è un agente riducente (cioè cede elettroni) per formare lo ione tetrationato (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>), in soluzione acida (ad es. acido acetico) avremo:



Quindi, il sodio tiosolfato reagisce con il sodio ipoclorito come segue:



Una volta aggiunto il tiosolfato, l'aerazione va svolta per 24 h coprendo il contenitore in maniera non ermetica in modo da garantire l'evaporazione del cloro libero (Cl<sub>2</sub>) eventualmente rimasto che causerebbe la morte della coltura.

Per la rimozione del cloro possono essere adottati anche altri metodi come le resine a scambio ionico, i filtri a carboni attivi oppure i trattamenti di aerazione e di stoccaggio temporaneo.

Il GLFDCC Great Lakes Fish Disease Control Committee (GLFDCC) raccomanda due ore di esposizione a 200 mg/l di cloro totale. Si tratta di una concentrazione estremamente elevata ed è stata pensata per una singola applicazione.

Bedell (1971) e Sanders et al. (1972) controllarono ma non eliminarono completamente *Myxosoma cerebralis* trattando l'acqua con 1-5 mg/l di cloro residuo. Tuttavia, la distruzione delle spore richiederebbe una concentrazione di cloro eccezionalmente elevata per esposizioni prolungate (Hoffman e Putz 1969).

Per i sistemi a ricircolo, una concentrazione di cloro residuo di almeno 1,0 mg/l per 10 minuti dovrebbe controllare efficacemente la maggior parte di virus e batteri. Tuttavia contro i virus si consiglia cautela.

Oltre che per il trattamento dell'acqua, il cloro può essere utilizzato per la disinfezione interna delle condotte e delle vasche di allevamento dopo che queste siano state svuotate. I trattamenti con soluzioni a base di cloro disinfettano le superfici eliminando le colonie batteriche e algali (Fetner et al., 1959).

## **2.2 La missione del CRIAcq**

Il “Centro interdipartimentale di ricerca per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura CRIAcq” è stato istituito nel 2000 come “Centro interdipartimentale di ricerca per l'Acquacoltura” allo scopo di creare un polo di ricerca interdisciplinare in acquacoltura nell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Il CRIAcq, partendo dal presupposto di un ritardo nell'espansione economica del settore nella regione Campania, si propose di diventare il polo scientifico-culturale-formativo integrato col territorio stesso.

La missione definita nei programmi del CRIAcq è la

*valorizzazione delle specie acquatiche autoctone mediterranee mediante una gestione responsabile delle risorse idrobiologiche e l'adozione di modelli produttivi per una acquacoltura ecocompatibile ed ecosostenibile in Campania*

Nel rispetto della missione storica del CRIAcq l'interdisciplinarietà del primo nucleo scientifico si è accresciuta negli anni e nel 2007 il Centro ha modificato il nome per seguire l'allargamento dei campi d'interesse alla gestione delle risorse idrobiologiche.

La missione del CRIAcq è da sempre stata lo studio, l'implementazione e la prototipizzazione di soluzioni tecnologiche innovative per i sistemi a circuito chiuso e per impianti off-shore.

Il CRIAcq ha così potuto portare avanti una serie di progetti per:

- ricerche di base e applicate nel campo dell'acquacoltura (valorizzazione delle specie

autoctone, tecnologie innovative in-shore ed off-shore);

- ricerche di base e applicate nel campo della corretta gestione delle risorse idrobiologiche (monitoraggio ambientale e soluzioni tecnologiche volte a minimizzare gli effetti derivanti dal prelievo dell'acqua, dallo scarico degli effluenti, dall'utilizzo di prodotti farmaceutici e sostanze chimiche e da altre attività legate all'acquacoltura);
- ricerche per l'identificazione e la produzione di biomolecole nutritive e funzionali a partire dai prodotti dell'acquacoltura e dai sottoprodotti dell'acquacoltura e delle industrie alimentari);
- trasferimento tecnologico ad imprese operanti nei settori dell'acquacoltura e della gestione delle risorse idrobiologiche;
- formazione di personale con elevata qualificazione professionale nei settori dell'acquacoltura e della gestione delle risorse idrobiologiche.

Proprio nella direzione di uno sviluppo ecosostenibile dell'acquacoltura, concepito per minimizzare le esternalità negative (emissioni di nutrienti, consumo energetico, ecc.) e massimizzare le esternalità positive (rese, biomolecole funzionali, nuove specie, ecc.), il CRIAcq ha rivolto la propria attenzione agli impianti a circuito chiuso, progettando e realizzandone diversi nei quali, accanto al ridotto consumo idrico, si è pensato a soluzioni per il totale recupero dei reflui attraverso una serie di operazioni unitarie.

Il CRIAcq ha da sempre riconosciuto nei sistemi a circuito chiuso la strada preferenziale per valorizzare l'immenso potenziale genetico (autoctono e no) delle acque ancora oggi mal sfruttato sia nei Paesi industrializzati che in quei Paesi dove l'acquacoltura potrebbe alleviare rispettivamente sia la crescente domanda di biomolecole funzionali che la cronica carenza di proteine animali e vegetali. Tuttavia, poiché l'acquacoltura è un universo di tecniche diverse dove non esistono soluzioni identiche per i diversi problemi ma solo linee guida da seguire, il CRIAcq sta studiando nuove soluzioni per l'introduzione in ambiente controllato, quale può essere un sistema a circuito chiuso appunto, di specie anche alloctone di interesse acquacolturale che apportino benefici sul piano nutrizionale, sociale ed economico rispettando i principi di ecosostenibilità ed ecocompatibilità.

L'obiettivo generale è implementare un modello produttivo che abbia determinate caratteristiche:

- ✓ economicamente sostenibile;
- ✓ impatto ambientale prossimo a zero;
- ✓ riproducibile in tutte quelle zone del pianeta dove vi è un deficit di fattori produttivi fondamentali quali l'acqua, la superficie, l'energia, il capitale.

Il deficit non è sempre imputabile a cause naturali, ma può essere una condizione derivante dalla

limitazione da parte del legislatore per usi particolari (es.: acqua) o dal mercato per l'elevato costo (es.: acquisto di terreni, tasse di concessioni).

La sostenibilità potrà essere perseguita anche grazie all'uso di fonti energetiche alternative rinnovabili e di espedienti tecnici rispettosi dell'ambiente.

## Capitolo 3

### 3.1 Scopo della ricerca

Lo scopo della ricerca è stato ottimizzare le produzioni colturali fitoplanctoniche intensive in grandi volumi attraverso metodiche rispettose dei principi dell'ecosostenibilità e dell'ecocompatibilità e per diversi fini applicativi.

Per verificare la bontà del sistema circuito chiuso si è stabilito dunque di testare le metodiche selezionate per le produzioni fitoplanctoniche per le prove di larvicoltura sempre in sistema a circuito chiuso nell'ambito di un'idea progettuale finalizzata all'introduzione nel nostro Paese di una specie ittica innovativa pregiata ed autoctona (*Psetta maxima*).

### 3.2 Piano sperimentale

Tale scopo (in accordo con l'obiettivo individuato dall'analisi dello stato dell'arte) è stato perseguito attraverso il seguente piano sperimentale articolato nelle seguenti fasi:

1. Organizzazione e gestione delle acque ricircuitanti.

Nell'ambito di tale prima fase è stata scelta la modalità di gestione delle acque a "pacchetti" (quantità definite di acqua ricircuitata differentemente trattata e stoccata per le differenti necessità del programma produttivo).

2. Trattamento meccanico-biologico delle acque del sistema a circuito chiuso e valutazione dei parametri chimici-fisici del refluo.
3. Colture algali per le finalità produttive prescelte in sistema a circuito chiuso. Ottimizzazione della produzione fitoplanctonica in piccoli e medi volumi (*fig. 3.1*).
4. Ottimizzazione protocolli di sterilizzazione per i grandi volumi e valutazione dei parametri microbiologici

Nell'ambito della fase 4 si è svolta la valutazione dei protocolli di sterilizzazione delle acque di ricircuitazione:

- metodo chimico mediante ipoclorito di sodio (300 ppm)
  - metodo fisico mediante raggi UV (96 h)
  - metodo misto (48 e 96 h; 100 ppm)
5. Caso studio: larvicoltura di *Psetta maxima* (*fig. 3.2*)

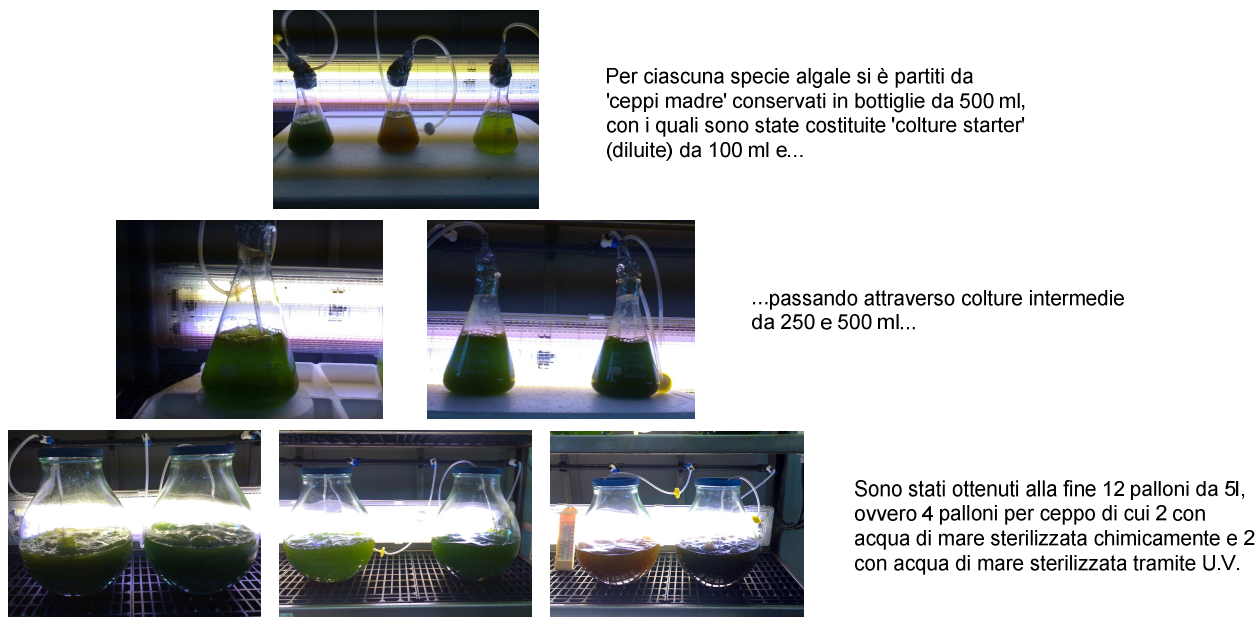


Figura 3.1. Ottimizzazione delle colture fitoplanctoniche in piccoli e medi volumi.

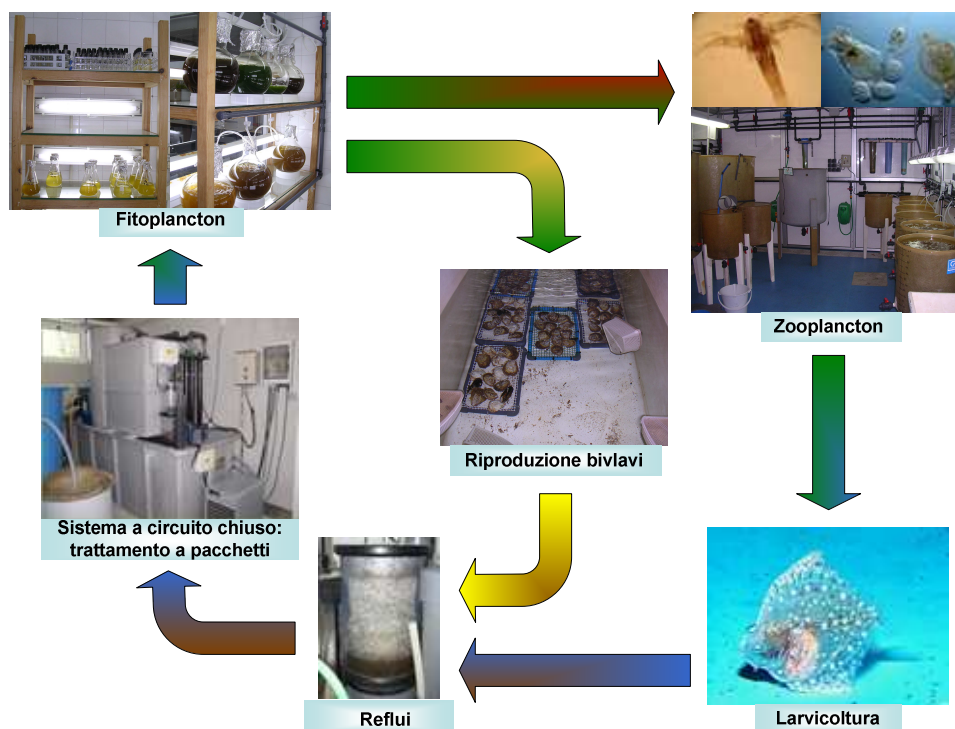


Figura 3.2. Sistemi a circuito chiuso: produzioni fitoplanctoniche per larvicoltura di *Psetta maxima* e riproduzione di bivalvi impiegando medium ottenuti da reflui trattati a pacchetti

## Capitolo 4

### 4 Materiali e metodi

#### 4.1 Gestione Fitocolture

##### 4.1.1 Obiettivo e risultati nella gestione di una coltura

L'obiettivo della gestione di una coltura è ottenere la massima resa giornaliera di alghe in modo che i *sistemi di coltura massiva* abbiano un buon rapporto costi/benefici. Tale rendimento deve continuare per lunghi periodi.

In particolare, negli allevamenti di *Molluschi Bivalvi* la coltura algale rappresenta circa il 40% dei costi sostenuti per allevare, in schiuditoio, seme di Bivalvi.

Per dare un'idea della quantità di alghe necessaria in uno schiuditoio di Ostriche, un milione di Ostriche con conchiglia di 3mm consumano ogni giorno 1.400 litri di alghe coltivate ad alta densità. Il fabbisogno giornaliero è minore nell'allevamento di riproduttori e larve.

##### 4.1.2 Coltura algale: un piccolo ecosistema

Una coltura algale costituisce un piccolo ecosistema ( *fig. 3.1* ): i nutrienti (minerali e/o organici) disciolti nel mezzo di coltura vengono metabolizzati (ed in parte mineralizzati se organici) dai Batteri e quindi nuovamente assimilati (organicati) dalle microalghe assieme alla CO<sub>2</sub> prodotta dalla respirazione batterica e/o introdotta dall'esterno.

A loro volta le microalghe durante la crescita non solo producono nuova sostanza organica, ma anche ossigeno, elemento essenziale per l'attività batterica.

Analogamente a quanto avviene nella biosfera, è la luce a sostenere l'intero ciclo e 'nobilitare', riportandoli ad un livello energetico più elevato, i nutrienti organici e minerali presenti nelle acque attraverso l'azione delle alghe e dei batteri associati.

Oltre a questa interazione di tipo bioenergetico-nutrizionale, altri sottili meccanismi chimico/fisici, che per lo più sfuggono alla nostra comprensione, regolano la funzionalità del consorzio microbico.

A questo secondo livello, più intimo e complesso, svolgono un ruolo importante le molecole "bioattive" prodotte dall'alga che stimolano alcuni batteri e ne inibiscono altri e molecole segnale che interferiscono con i meccanismi di regolazione *quorum sensing* dei batteri e potrebbero essere responsabili della morte cellulare programmata (PCD = *programmed cell death*).

##### 4.1.3 Biotecnologia delle colture algali massive

Lo sfruttamento delle microalghe non può prescindere da un adeguato sistema di coltura. I sistemi per produrre il Fitoplancton sono essenzialmente due:



⇒ In ambiente controllato

⇒ In ambiente non controllato

Nel primo caso trattasi di un sistema di coltura intensiva, eseguito al coperto con illuminazione artificiale. Si svolge per lo più in appositi sistemi chiusi (*fotobioreattori*) di varia tipologia; distinti in base all'orientamento, all'inclinazione, al sistema di agitazione e ossigenazione dell'acqua ed ai materiali costruttivi (vetro, lastre di plastica rigida, film plastici flessibili, vetroresina, *ecc.*).

Nel secondo caso si tratta di una coltura estensiva all'aperto, eseguita in grandi vasche o bacini, sfruttando la luce naturale. I bacini aperti sono indubbiamente più facili da gestire, oltre che più economici, e tra questi le vasche "raceway" sono le più diffuse, ma in tali sistemi si verificano difficoltà per il controllo dei contaminanti, la perdita di ingenti quantitativi di acqua per evaporazione e l'apporto di acqua piovana con forti variazioni di salinità conseguenti.

Inoltre le tecniche estensive, oltre ad essere non molto produttive, tendono a rendere difficile l'allevamento di monoculture, per cui si utilizzano generalmente per colture mista.

La biotecnologia algale sembra ormai puntare sui sistemi chiusi, che consentono rese più elevate oltre alla monocultura di quelle specie che, non crescendo su mezzi selettivi, stentano a crescere nei bacini aperti.

I ceppi algali possono comunque deteriorarsi nel tempo o andare incontro ad un inquinamento di alghe appartenenti a taxa diversi o di altri organismi (*Batteri, Protozoi, ecc.*).

Nel nostro caso, per l'importanza in campo industriale e per finalità, tratteremo i sistemi intensivi in ambiente controllato.

#### **4.1.4 Allevamento a lotti e in semi-continuo**

Le colture intensive in "grandi volumi", utilizzate nell'alimentazione delle specie allevate, possono essere ricondotte a due tipologie: in semi-continuo o a lotti.

La *coltura a lotti* (modalità *batch*) consiste, una volta inoculata la specie desiderata nel mezzo di coltura prescelto (che rimane costante), nella rapida crescita fino a quando ogni ulteriore aumento della densità cellulare risulta inibito a causa di molteplici fattori.

Le cellule tendono a raggiungere così un livello tale (*stato stazionario*) da impedire l'aumento del loro numero. Sono però raccolte prima di tale fase; quando raggiungono il massimo della *crescita esponenziale* e sta per iniziare la *fase statica*.

Si raccoglie la coltura, si lava e sterilizza il contenitore e si ricomincia una nuova coltura. Si ha quindi il completo esaurimento della coltura una volta che questa giunge a maturazione. E' fondamentale inoculare i nuovi volumi con popolazioni di sufficiente densità, al fine di assicurare una rapida crescita delle colture stesse ed inibire quella di organismi competitori.

Con il *metodo semi-continuo* invece, una volta giunti a volume in una o più serie di contenitori, in

genere sacchi in plastica trasparente da 400l (in seguito ad una sequenza di inoculi in volumi crescenti), questi ‘grandi volumi’ vengono riforniti ininterrottamente oltre che di aria, anidride carbonica e luce (come nel metodo precedente), anche di acqua e nutrienti, ovvero: le colture vengono parzialmente raccolte durante la fase di *crescita esponenziale* (25-50% del volume totale) e la quantità raccolta viene sostituita con nuovo mezzo di coltura. Con tale metodo la frequenza di raccolta dipende dalla velocità di crescita della specie (ad *es.* per la *Tetraselmis suecica* circa tre volte alla settimana). Una alternativa è quella di ottenere da ogni singolo contenitore, in continuo, un piccolo flusso di coltura algale (dato dall’overflow delle alghe che crescono); la quantità raccolta viene sostituita con un nuovo mezzo di coltura (*metodo in continuo*).

Con questi metodi la vita della coltura viene prolungata e la durata della stessa dipende dalla specie considerata, ad esempio per alcune specie particolarmente robuste come *Tetraselmis suecica*, la coltura può durare anche più di tre mesi. Il vantaggio di questo tipo di coltura è che le alghe sono prodotte in *fase di log* (piena crescita esponenziale), ovvero quando sono generalmente più ricche di nutrienti rispetto ad una fase più vicina alla stazionaria.

In genere, si utilizza la coltura a lotti per le specie delicate e per le *Diatomee* a sviluppo rapido, mentre specie più robuste appartenenti alle *Flagellate* sono principalmente coltivate con il metodo semi-continuo.

#### **4.1.5 Il ciclo algale**

In riferimento alle alghe si possono descrivere 4 stadi di crescita (*fig. 4.2*), così suddivisi:

1. *Fase di latenza o adattamento*: dura circa 24 ore, non c’è crescita e corrisponde ad un periodo di adattamento del ceppo algale inoculato. Tale fase è anche detta di ritardo o *lag phase*.
2. *Fase di crescita (di sviluppo, esponenziale, o log phase)*: è la fase di maggior produzione attiva ed è caratterizzata da crescita esponenziale delle cellule algali; la durata di tale fase è variabile a seconda della specie e delle condizioni della coltura e può variare da 3-4 giorni fino a più di 20 giorni.
3. *Fase di passaggio tra la crescita esponenziale e lo stato stazionario*: la riproduzione delle cellule algali dopo aver raggiunto la massima concentrazione comincia a rallentare fino a smettere quasi totalmente (*stato stazionario*). Ciò è dovuto alla riduzione dei nutrienti disponibili, alla produzione di metaboliti da eliminare e all’impenetrabilità della luce nella coltura.
4. *Stadio stazionario*: in tale fase il numero delle cellule non presenta variazioni sostanziali poiché le cellule smettono quasi di riprodursi; è avvenuta infatti una modificazione chimica del substrato, che influenza negativamente la crescita cellulare. Può protrarsi per diversi

giorni (7-10) nel caso delle *Flagellate*, o soltanto per un breve periodo nel caso delle *Diatomee*; infatti mentre le colture di *Flagellate* in questa fase riciclano i nutrienti tratti da cellule morte o in decomposizione, nel caso delle *Diatomee*, queste producono metaboliti auto-inibenti che attirano crescite di Batteri, causando il crollo della coltura.

5. *Fase finale o letale*: arresto totale della crescita e successiva morte cellulare.

Come già esposto, il momento più adatto per prelevare un'aliquota di coltura algale sufficiente per l'inoculo di altri volumi è la fase di crescita, ovvero la fase di pieno vigore esponenziale.

I microrganismi così ottenuti vengono sia impiegati per il lancio di nuove colture che per l'alimentazione (solo colture massive). Nel primo caso permetteranno di ottenere nuove colture con ottime capacità di crescita e qualità, nel secondo caso rappresenteranno un ottimo alimento.

Al momento dell'inoculo della coltura *starter* la densità delle cellule algali nel mezzo di coltura è di 25-50 cellule/ $\mu$ l. Dopo l'inoculo le cellule si sviluppano e si separano a velocità crescente, man mano che si acclimatano alle condizioni di coltura. Tale periodo di acclimatemento ha una durata di 2 o 3 giorni, dopo il quale le cellule aumentano il loro ritmo di separazione con conseguente aumento logaritmico del loro numero in coltura. Questa fase si protrae per 4-6 giorni.

Successivamente, mano mano che la luce incontra maggiori difficoltà a penetrare attraverso la coltura e/o i nutrienti a disposizione diminuiscono, la velocità di separazione delle cellule diminuisce. Inizia così la fase statica che può protrarsi per diversi giorni.

Tali densità possono, entro certi limiti, essere aumentate potenziando l'intensità della luce applicata alle colture, mantenendo il pH a circa 7,5 con applicazione controllata di CO<sub>2</sub> e/o aggiungendo un supplemento di nutrienti mano a mano che aumenta la densità della coltura.

In questo esempio, inoltre, le *colture a lotti* sarebbero raccolte ad una densità di circa 2.000 cellule per microlitro mentre quelle *semi-continue* ad una densità di circa 1.500 cellule per microlitro.

#### 4.1.6 Operazioni del processo di coltura algale

La coltura intensiva di microalghe in ambiente controllato è preceduta dalle seguenti operazioni:

- Preparazione del mezzo di coltura;
- Allestimento della '*stanza fitoplancton*' e sterilizzazione attrezzatura/recipienti;
- Sterilizzazione dell'acqua, regolazione della salinità ed inoculo di terreni di coltura e vitamine;
- Isolamento e conservazione dei 'ceppi algali'.

Una volta eseguite le operazioni preliminari inizia il *ciclo di produzione* algale passando dalla coltura in piccoli volumi (beute 250 ml) a volumi sempre maggiori, fino ad arrivare alla coltura intensiva vera e propria ( *fig. 4.3* ), in volumi superiori ai 50 l effettuata in *fotobioreattori* di varia natura (in genere sacchi in PVC o polietilene trasparenti). Tale ciclo prevede:

1. *Mantenimento degli stock di coltura*: inoculi in piccoli volumi (beute da 15 - 250 ml) e condizioni ambientali tali da non favorirne la rapida crescita ma una buona conservazione.
2. *Colture di partenza o starter*: inoculi in piccoli volumi (beute da 250 ml) e condizioni ambientali tali da favorirne la rapida crescita.
3. *Produzione di alghe su piccola scala*: inoculi in volumi intermedi (bocce da 1 - 5 l) e condizioni ambientali tali da favorirne la rapida crescita.
4. *Colture su vasta scala in sacchi di polietilene*: inoculi in grandi volumi (sacchi > 50 l) e condizioni ambientali tali da favorirne la rapida crescita (modulo in *batch* o in *continuo*).
5. *Controllo della crescita e delle condizioni algali*.
6. *Raccolta*.

Grande cura va posta nell'effettuare gli inoculi allo scopo di aumentare i volumi di coltura. E' molto importante effettuarli al momento opportuno grazie ad un adeguato monitoraggio della crescita/salute della coltura e seguire rigidi protocolli di sterilità e pulizia di materiali, superfici, contenitori, *ecc.* durante le operazioni.

#### **4.1.7 Parametri fondamentali delle colture algali**

Allo scopo di creare le condizioni migliori per la crescita della popolazione cellulare è necessario predisporre al meglio una serie di parametri:

- Terreno di coltura;
- Luce (intensità e fotoperiodo);
- Temperatura;
- Densità;
- Salinità;
- Sterilizzazione dell'acqua (oltre che del materiale adoperato);
- Aerazione;
- pH.

I terreni hanno lo scopo di arricchire l'acqua di mare (sterilizzata) con nutrienti, sali minerali, metalli e vitamine; i vari terreni possono variare nel contenuto dei diversi elementi.

Trattandosi di organismi vegetali l'illuminazione è fondamentale per consentire la fotosintesi. A meno che non si tratti di una coltura all'aperto, essa è fornita di lampade al neon (in grado di fornire uno spettro luminoso adatto alle esigenze fotosintetiche delle alghe), situate all'esterno o all'interno dei contenitori di coltura, in potenza e numero variabili a seconda della dimensione dei contenitori e della fase in cui si trova la coltura. Tuttavia, non è semplice stabilire la giusta quantità di luce da fornire alle microalghe, perché le variabili che entrano in gioco sono molteplici (volume del contenitore, densità della coltura, distanza dalla fonte luminosa, diametro dei recipienti *ecc.*).

Inoltre, anche una eccessiva illuminazione può danneggiare la coltura innescando fenomeni di fotoinibizione. Ad *es.* per raggiungere l'obiettivo di 15.000-25.000 lux al centro di una beuta vuota, nel caso di beute da 3 l del diametro di circa 18 cm, sono necessarie due lampade da 65/80 W, mentre ne occorrono 5 per recipienti da 25 l e 35 cm di diametro.

Il fotoperiodo indicato come ideale oscilla tra le 16 e le 18 ore di luce, ma si può arrivare fino a 24 se si necessita di una maggiore quantità di fitoplancton, poiché l'illuminazione continua accelera lo sviluppo. E' invece sconsigliato scendere al di sotto delle 15 ore giornaliere d'illuminazione, perché un periodo troppo prolungato di buio potrebbe fare aumentare il livello di CO<sub>2</sub> e far morire le microalghe per mancanza d'ossigeno.

Un altro parametro da cui dipende lo sviluppo della coltura è la temperatura. La temperatura ideale dipende dalla specie algale che si vuole allevare. Tuttavia, la maggior parte delle alghe allevate vivono a temperature comprese tra 20 e 25 °C. Allevare tali microalghe a temperature più basse o più alte anche di 3 o 4°C dal loro optimum non compromette la sopravvivenza della coltura. Bisogna però prestare attenzione a non scendere sotto i 16°C poiché si può causare un estremo rallentamento della crescita algale mentre, nella direzione opposta, temperature superiori ai 33-35°C sono mortali per quasi tutte le specie.

Tuttavia, il parametro climatico, in determinate regioni influenza la scelta del tipo di microalga da coltivare, ad *es.*, in regioni calde si utilizza al meglio *Nannochloropsis oculata*, piuttosto che nelle regioni fredde dove si preferiscono altre microalghe come *Isochrysis galbana* (a patto di mantenere l'impianto a 20°C).

Il *fitoplacton* marino si adatta bene a varie densità di coltura, in particolare l'andamento della densità segue la curva di crescita algale e la densità massima (così come le dimensioni delle singole alghe) è condizionata dai volumi di allevamento.

La salinità ottimale può variare a seconda delle specie:

- le *Diatomee*, come *Chaetoceros sp.* e *Thalassiosira sp.*, raggiungono tassi di crescita e di separazione ottimali a circa 20 parti per mille;
- molte *Flagellate* raggiungono il livello ottimale di produttività a 25-30 parti per mille.

Il *fitoplancton* marino si adatta comunque bene ai diversi gradi di salinità ed in realtà sembra crescere meglio a salinità inferiori a quelle ambientali.

Per mantenere in sospensione le microalghe è necessario fornire alla coltura un'aerazione moderata ma continua che, oltre ad evitare che le microalghe precipitino sul fondo, fa sì che ogni singola alga riceva adeguate quantità di luce e di nutrienti. Inoltre aiuta ad "allontanare" un eventuale eccesso di CO<sub>2</sub>, mantenendo così stabile il pH che dovrebbe essere compreso tra 8,2-8,7.

L'acqua marina deve essere quindi diluita con acqua dolce pura, prima di essere filtrata e/o

sterilizzata, in genere con ipoclorito di sodio (sterilizzazione chimica) o con altre tecniche.

Dei molteplici fattori in grado di influenzare la crescita di una coltura fitoplanctonica, la sterilità dell'acqua ha sicuramente una delle implicazioni economiche e gestionali più rilevanti.

## **4.2 Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili**

### **4.2.1 Specie algali allevate**

Le specie algali utilizzate, come detto, sono: *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*.

(1) *Nannochloropsis oculata*, piccola alga verde scuro (2-6 µm) contenente come pigmenti *clorofilla* e *carotenoidi*, appartiene al regno *Protista*, divisione *Heterokontophyta*, classe *Chrysophyceae*.

Si tratta di un'alga con parete cellulare spessa e solida che la protegge da possibili danni causati da un eccessivo movimento durante il processo di microcoltura.

È caratterizzata inoltre da una rapida crescita, che tuttavia talvolta ne limita la digestione da parte degli animali.

Contiene un livello di acidi grassi EPA (altamente insaturi) molto elevato ed un alto contenuto sia di vitamina B12, che di proteine (intorno al 52% di biomassa secca). Mentre la B12 è utile alla crescita e alla riproduzione dei *rotiferi* del genere *Brachionus* (anche perché le sue dimensioni la rendono adatta a tutti i tipi di *Zooplankton*), l'EPA è fondamentale sia per le larve più giovani dei pesci marini che per i *molluschi bivalvi*. Per questi motivi, oltre al fatto che è utilizzabile sia in acqua dolce che salata, è stata scelta, fra le altre, per l'allestimento delle fitocolture.

(2) *Tetraselmis suecica* è un grande flagellato mobile di colore verde (8-16 µm), dotato di un unico cloroplasto, contenente *clorofilla a* e *b* e *carotenoidi*, completamente verde. Appartiene al Regno *Plantae*, divisione *Chlorophyta*, classe *Prasinophyceae*.

Le *Chlorophyta* presentano gli stessi tipi di *clorofilla* ed i *carotenoidi* delle Piante superiori e per tale motivo vengono considerati come gli organismi vegetali da cui si sono originate le piante terrestri. La sostanza di riserva principale è l'*amido*.

Per la sistematica delle *Chlorophyta* assume una grande importanza l'ultrastruttura dell'apparato flagellare nel punto di inserzione del flagello stesso e *Tetraselmis*, in particolare, risulta caratterizzata da quattro flagelli. Presenta un corpo ricoperto da una *teca* costituita da strutture simili a scaglie (caratteristica tipica delle *Prasinophyceae*), presenti sia sulla superficie cellulare che sui flagelli. La riproduzione avviene per via vegetativa, ovvero per semplice divisione cellulare (in altri casi si ha una riproduzione sessuata, mediante la formazione di *zoospore*). Il quantitativo di

EPA sebbene abbondante e superiore a quello di *Isochrysis galbana*, è inferiore rispetto a *Nannochloropsis oculata*. *Tetraselmis suecica*, possiede un alto contenuto proteico (circa il 54% di sostanza secca) e amminoacidi naturali che stimolano l'appetito negli animali marini. Le cellule, di grandi dimensioni, possono essere utili anche come alimento da usare direttamente per l'allevamento di organismi che sono troppo piccoli per accettare *rotiferi* ed inoltre si presta bene a colture di tipo massivo. Per questi motivi è stata scelta, fra le altre, per l'allestimento delle fitocolture.

(3) *Isochrysis galbana* è un piccolo flagellato mobile unicellulare (3-6 µm) la cui colorazione verde/marrone è dovuta ai pigmenti fotosintetici clorofilla *a* e *c*, *fucoxantina*, *β-carotene*, *diadinoxantina* e *diatoxantina* ed al prodotto di riserva, conservato in vacuoli specializzati, *crisolaminarina*. Appartiene al Regno *Protista*, divisione *Haptophyta* classe *Haptophyceae*. Le specie più usate sono *I. galbana* e in misura minore, *I. tahiti* (T-ISO). Le *Haptophyceae* comprendono forme unicellulari, a volte coloniali e filamentose, generalmente marine, che presentano due flagelli lisci di eguale lunghezza ed un terzo filamento detto *aptotema* che possiede varie funzioni (adesione al substrato, sensore, trasporto del cibo). Nello specifico però, *I. galbana* è sprovvista di *aptotema* e presenta una superficie cellulare ricoperta da scaglie di natura cellulosa. La riproduzione è agamica ed avviene per divisione longitudinale.

*Isochrysis galbana* ha un alto contenuto di acidi grassi polinsaturi ed in particolare un alto livello di DHA (che la contraddistingue da *T. suecica* e *N. oculata*), oltre che un elevato contenuto proteico (intorno al 47% della sostanza secca).

Per le sue buone qualità nutrizionali e le piccole dimensioni, che la rendono adatta all'alimentazione degli stadi larvali di *molluschi bivalvi*, *pesci* e *crostacei*, oltre che per l'arricchimento di *rotiferi*, *copepodi* ed *artemie*, e la velocità di crescita, è stata scelta come specie da testare per l'ottimizzazione del protocollo di sterilizzazione dell'acqua nei grandi volumi e per l'allestimento delle fitocolture per il caso studio finale.

#### **4.2.2 Terreno di coltura utilizzato**

Per la crescita delle tre specie algali selezionate fu impiegato il medium Guillard's F/2 – Si (silicati), formulato nel 1975 e uno tra i più usati in acquacoltura per l'allevamento delle microalghe. La composizione è di seguito riportata in tabella.

Tale terreno è stato preparato in bottiglie di vetro borosilicato da 1 l autoclavate a 121°C per 20 minuti e conservato a temperature di 4°C (*fig. 4.4*).

L'autoclave infatti sterilizzando attraverso vapore sotto pressione risulta più efficace del calore secco. Le vitamine furono aggiunte alle colture a parte per evitare che il passaggio in autoclave le distruggesse.

***Guillard's F/2 medium***

1. Nitrato di Sodio	NaNO <sub>3</sub>	75.0	g/l
2. Fosfato di Sodio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	5.0	g/l
3. Metasilicato di Sodio	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> *9H <sub>2</sub> O	30.0	g/l
4. Metalli in tracce			
	FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	3.5	g
	Na <sub>2</sub> EDTA*4H <sub>2</sub> O	36.0	g

Sciogliere in 900 ml di acqua distillata.

Aggiungere 1 ml di ognuna delle soluzioni contenenti metalli in tracce (soluzioni minerali)

Solfato di Rame	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.98	g/100 ml
Solfato di Zinco	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2.20	g/100 ml
Solfato di Rame	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1.00	g/100 ml
Manganese cloruro oso	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	18.00	g/100 ml
Molibdato di Sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.63	g/100 ml

Portare il volume ad 1 l con acqua distillata (pH ca. 2.0)

Aggiungere 1 ml per litro FSW delle soluzioni di cui sopra (#1-4).

**5. Soluzione Vitaminica**

Biotina (Vitamina H)	1.0	mg
Cianocobalamina (Vitamina B-12)	1.0	mg
Tiamina HCl (Vitamina B1)	20.0	mg

Sciogliere le vitamine indicate in 1 l di acqua distillata e mantenere la soluzione in frigorifero per evitare la degradazione delle vitamine.

Aggiungere 1/2 ml della soluzione vitaminica per ogni l di FSW.

Al di là della composizione specifica riportata in tabella, il terreno è acquistato in pacchetti pronti per la preparazione, all'interno dei quali sono presenti le varie componenti in polvere già dosate e pronte da sciogliere in acqua nelle dosi indicate.

**4.2.3 Calcolo e modifica della salinità**

Nell'acqua sono presenti diverse specie di ioni positivi (sodio Na<sup>+</sup>, potassio K<sup>+</sup>, calcio Ca<sup>++</sup>, magnesio Mg<sup>++</sup>) e negativi (cloruro Cl<sup>-</sup>, idrogeno carbonato HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, solfato SO<sub>4</sub><sup>-</sup> e nitrato NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).



L'acqua di mare, prelevata per la crescita algale, ha una salinità che si aggira intorno al 36‰ (g/L). Tuttavia, a causa della permanenza in volumi limitati come le cisterne e le vasche, compresa la vasca dove è ripetutamente sterilizzata tramite filtro e lampada UV, la salinità tende ad aumentare, a causa dell'evaporazione che può avvenire in quantità differenti a seconda delle temperature ed agitazione dell'acqua stessa.

Per tale motivo la salinità dell'acqua di mare adoperata per le fitocolture, prima di essere utilizzata è stata riportata a valori adatti alle stesse, nel nostro caso ad una salinità del  $33 \pm 2$  ‰, sebbene sovente si utilizzino per le fitocolture valori inferiori di salinità. Per controllare la salinità si effettuano misurazioni mediante salinometro.

#### **4.2.4 Sterilizzazione tramite U.V.**

Per la sterilizzazione in continuo tramite UV è stato predisposto un modulo, nella sala molluschicoltura, costituito da una vasca da 1000 l collegata a 3 filtri meccanici, rispettivamente da 100, 50 e 10 micron (la differente grandezza delle maglie consente di rimuovere materiali a granulometria diversa: dal sedimento più grossolano a quello più fine; ciò garantisce una maggiore sterilità dell'acqua) ed a 2 lampade UV da 25 watt, 2000 l/h.

#### **4.2.5 Sterilizzazione chimica dell'acqua**

Per la sterilizzazione chimica dell'acqua sono state preparate di volta in volta i volumi di acqua necessari agli inoculi in bottiglie da 2 l.

La sterilizzazione è stata predisposta il giorno precedente ai vari inoculi, utilizzando ipoclorito di sodio al 5% di cloro attivo in quantità pari a 200µl per litro di acqua (250 ppm). La soluzione così ottenuta è stata mantenuta chiusa (non alla luce diretta) per 24 h, per consentire al cloro di svolgere la sua azione sterilizzante attaccando le membrane cellulari batteriche.

Passate le 24 ore veniva aggiunto all'acqua tiosolfato di sodio al 12,5% in quantità doppia all'ipoclorito. Il tiosolfato garantisce la neutralizzazione dell'ipoclorito, evitando che l'eventuale cloro libero residuo, ancora presente nell'acqua, continui la sua azione battericida.

Una volta aggiunto il tiosolfato, l'acqua è lasciata ad aerare per 12h, coprendo il contenitore in maniera non ermetica in modo da garantire l'evaporazione del cloro libero, eventualmente rimasto, che causerebbe la morte della coltura.

#### **4.2.6 Sterilizzazione attrezzatura**

L'attrezzatura (consistente in: beute, palloni, tubi in gomma per aerazione, tappi in plastica e vari cilindri graduati), è stata sterilizzata chimicamente immergendo i vari materiali in acqua e ipoclorito per 24 ore (*fig. 4.5*). Successivamente i materiali sono stati sciacquati prima con acqua dolce e poi con acqua distillata oppure, se preparati qualche giorno prima, sono stati semplicemente lasciati

all'aria, per consentire l'evaporazione del cloro residuo.

In particolare, mentre per i palloni da 5 l, così come per l'attrezzatura in materiale plastico, si è effettuata solo la sterilizzazione chimica, le beute di piccolo volume (250 e 500 ml) sono state ulteriormente sterilizzate in stufa a secco a 120°C per 1h e lasciate poi raffreddare per un'altra ora.

Ove necessario è stato inizialmente utilizzato acido cloridrico per eliminare residui di precedenti colture.

L'acido è stato sciacquato abbondantemente con acqua dolce prima dell'immersione del materiale in candeggina.

Per quanto riguarda in particolare i tubi in gomma da utilizzare per l'aerazione, successivamente alla sterilizzazione chimica e prima del loro utilizzo, è stata fatta passare aria all'interno degli stessi onde eliminare residui di acqua e cloro eventualmente ancora presenti.

#### **4.2.7 Conta batterica**

La conta dei batteri coltivabili a 37° C è stata effettuata con il metodo dell'inclusione.

Il PCA (plate count agar) medium è stato dapprima sciolto mediante bollitura e poi raffreddato a 42° C in bagnetto termostato. Per ogni campione sono state effettuate 4 piastre: 2 contenenti 1 ml di campione e 2 contenenti 0,1 ml di campione. Dopo aver caricato il campione nella piastra petri, si versava il PCA raffreddato nella quantità di 16 ml. Il contenuto delle piastre è stato miscelato per rotazione.

In ogni sessione di analisi sono state effettuate 2 piastre di controllo per verificare la procedura.

La conta era effettuata dopo almeno 48 ore ed era frutto del seguente calcolo:

$$[(CFU \text{ su piastra con } 1 \text{ ml}) + (CFU \text{ su piastra da } 0,1 \text{ ml}) * 10] / 2$$

#### **4.2.8 Procedura per effettuare gli inoculi in sterilità**

Le operazioni per maneggiare le colture devono essere fatte seguendo determinate procedure al fine di evitare la contaminazione delle colture stesse. La procedura seguita per gli inoculi è la seguente:

1. Rimozione del tappo in cotone idrofilo dalla beuta contenente la coltura riproduttiva;
2. Sterilizzazione del collo della beuta tramite esposizione alla fiamma di un becco *Bunsen* (bruciatore a gas);
3. Travaso di un inoculo, del volume desiderato, in un'altra beuta sterile contenente il mezzo di coltura sterilizzato in autoclave;
4. Flambato il collo di questa seconda beuta, inserimento del tappo, costituito da un batuffolo di cotone idrofilo sterile (fiammeggiato), avvolto da una porzione di parafilm aderente e da un ulteriore pezzo di carta argentata, flambata nella parte interna (velocemente in modo da non sciogliere il parafilm una volta a contatto);
5. Marcatura della beuta con il nome della specie, la data e il tipo di sterilizzazione dell'acqua

utilizzata, utilizzando un pennarello indelebile.

Tutte le operazioni sono state effettuate manualmente indossando guanti in lattice.

Tali accortezze sono state utilizzate anche quando si sono prelevati i campioni da analizzare e contare; sia dalle beute di vario volume, che dai palloni. I prelievi essendo di 1 ml sono stati effettuati con delle pipette monouso ed il campione è stato posto in una provetta da 5ml.

#### **4.2.9 Conta cellulare con emocitometro ‘manuale’ (camera di Bürker)**

Per la conta algale è stata utilizzata, per tutta la durata dell’esperimento, la conta diretta con microscopio delle cellule contenute in un volume noto di campione attraverso l’impiego di Camere di Conta: più specificatamente tramite Camera di Bürker (*fig. 4.6*).

La camera di Bürker è costituita da un vetrino inciso superficialmente. L’incisione forma un reticolo quadrettato atto a osservare le cellule al microscopio. Tanto l’area del reticolo quanto lo spessore tra il reticolo ed il vetrino coprioggetto sono noti, quindi è possibile determinare il volume di campione contenuto in ogni riquadro del reticolo e contare il numero di cellule, calcolando la concentrazione delle stesse per ml.

Per contare le cellule con la camera di Bürker, prima di tutto è necessario preparare e sistemare il campione sulla camera (*fig. 4.7*). Si agita bene la coltura cellulare; tramite una pipetta si preleva 1 ml della stessa e si travasa in una provetta sterile, nel nostro caso da 5 ml (ovviamente si *flamba*, come detto, il collo della beuta/pallone prima e dopo il prelievo ed eventualmente si sostituisce il tampone). Questa operazione è effettuata per ogni coltura in modo da ottenere un campione di ciascuna. Si prelevano 10 $\mu$ l dal campione con una pipetta *Pasteur*. Si lascia fuoriuscire la goccia del campione che per capillarità si diffonderà nella camera di Bürker. Si effettua così, al microscopio, una prima analisi di qualche campione per valutarne la mobilità e quindi la vitalità dello stesso (oltre alla presenza di eventuali organismi competitori).

Successivamente, in ogni campione (1ml) da contare, si aggiunge un 10 % di formalina, in modo che le cellule non si muovano nel vetrino rendendo così possibile la conta. In fase di conta non sono distinguibili le cellule vive da quelle morte. Sciacquata la camera con acqua distillata ed asciugata, si inserisce un’altra goccia (10  $\mu$ l) di campione.

Dato che il vetrino è costituito da due cavità, ovvero 2 camere, in ognuna sono inseriti 10 $\mu$ l di campione; questo consente di avere un duplicato del campione, nel caso in cui la lettura del primo sia ostacolata da alcuni fattori come; residui di sporco non rimossi nel vetrino stesso o cellule mal distribuite.

Ovviamente, man mano che le concentrazioni delle colture cellulari aumentano per poter valutare il campione è necessario diluirlo (con acqua di mare alla stessa salinità del campione) con un volume noto diminuendone quindi la concentrazione. Nel calcolo sarà necessario tenere presente la

diluizione (*fattore di diluizione*).

Tale metodo di conta risulta tuttavia inadeguato per campioni con densità cellulare molto bassa o per campioni con cellule molto piccole; la differente dimensione delle cellule influenzerà la scelta dell'obbiettivo.

La griglia totale della camera è suddivisa in 9 quadrati più grandi (Q), delimitati ciascuno da tre linee affiancate (3 linee verticali e 3 orizzontali dello spessore totale di 0,05 mm ovvero 1/20 di mm), della dimensione di 1,0 x 1,0 mm. Uno speciale vetrino coprioggetto è posizionato sopra le 2 camere conferendogli una profondità di 0,1 mm per cui, il volume totale di ciascun quadrato (Q) è di  $1,0 \times 1,0 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$ .

Ognuno di questi quadrati è a sua volta suddiviso internamente in altri quadrati e rettangoli delimitati da due linee affiancate: 16 quadrati (C) aventi lati di 8/40 di mm ovvero di 0,2 x 0,2 mm ( $0,04 \text{ mm}^2$ ); 24 rettangoli (B) di 8/40 di mm il lato maggiore e 2/40 di mm quello minore, ovvero 0,2 x 0,05mm ( $0,01 \text{ mm}^2$ ) e 9 quadrati (A) aventi lati di 2/40 di mm ovvero di 0,05 x 0,05mm ( $0,0025 \text{ mm}^2$ ). Lo spessore, dato sempre dal coprioggetto è pari a 0,1 mm per tutti i rettangoli e quadrati.

È stato considerato il numero di cellule presenti mediamente in un 'quadrato grande' (Q); ciò è stato ottenuto contando le cellule presenti in 5 dei 9 quadrati grandi in cui è suddivisa una camera e facendo la media del valore ottenuto.

Ovvero, partendo dalla prima camera si contano le cellule nel quadrato (Q) centrale e nei 4 quadrati (Q) agli angoli; in tale conta vengono incluse le cellule in alto ed a sinistra che toccano la linea centrale del perimetro di ciascun quadrato, mentre non si contano quelle che toccano la linea centrale in basso e a destra.

La procedura va ovviamente ripetuta nella seconda camera.

Per quanto riguarda l'obbiettivo è stato utilizzato un 10x per *Tetraselmis suecica* (che consente di vedere un intero quadrato Q della camera), mentre per *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata* un 40x.

Dato che, come detto ciascun quadrato (Q) della camera, con il coprioggetto in posizione, ha un volume di  $0,1 \text{ mm}^3$  o di  $10^{-4} \text{ cm}^3$ ; essendo  $1 \text{ cm}^3$  equivalente a 1 ml la concentrazione di cellule per ml sarà determinata con il seguente calcolo:

$$\text{Cellule / ml} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

#### **4.2.10 Conservazione dei ceppi algali**

La sperimentazione è iniziata prelevando 200 ml da ciascuna madre:

- 100 ml da mantenere in frigorifero ( $4-6^\circ\text{C}$ ) in provette da 5 ml (ovvero 20 provette per ceppo per un totale di 60 provette);

- 100 ml travasati in altrettante provette lasciate alla luce ed alla T ambiente di 19°-20°C.

Successivamente è stato prelevato, da ogni madre, un campione (1 ml) travasandolo in una provetta monouso da 5 ml per effettuare la conta algale tramite la 'camera di Bürker' e per verificarne lo stato di salute.

Le madri si presentavano in buone condizioni vitali e assenti da contaminazione nonostante il trasferimento dalla Stazione Zoologica e le concentrazioni iniziali riscontrate erano: 320.000 cell/ml per *Tetraselmis suecica*; 1.360.000 cell/ml per *Isochrysis galbana* e 3.980.000 cell/ml per *Nannochloropsis oculata*.

#### **4.2.11 Colture starter delle tre specie**

Il giorno seguente sono stati portati alla salinità del 36‰, 2 l di acqua sterilizzata tramite UV e 2 l di acqua sterilizzata chimicamente.

Si è così effettuato l'inoculo delle *colture starter* dei tre ceppi algali in beute da 250 ml (*fig. 4.8*) mediante diluizione di 20 ml di ogni coltura madre (dai restanti ml in ogni bottiglia) in 100 ml di terreno.

L'inoculo è stato quindi effettuato in 12 beute, 4 per ceppo e per ogni quartetto: 2 con acqua di mare sterilizzata chimicamente e 2 con l'UV (in duplicato). Le 12 beute sono state marcate oltre che con la data e sigla di riconoscimento della specie, con la modalità di sterilizzazione dell'acqua (T1, T2, Tuv1, Tuv2, I1, I2, Iuv1, Iuv2, N1, N2, Nuv1, Nuv2).

Per effettuare l'inoculo, le beute sono state precedentemente riempite con 80 ml di terreno costituito dall'acqua di mare sterilizzata (6 chimicamente e 6 con UV) con aggiunta di 40µl di terreno di Guillard f/2 (40 ml in 100 l) ed infine 10µl di vitamine. La quantità standard di vitamine (5 µl) è stata aumentata in modo da favorire la crescita delle alghe. Infine sono stati inoculati, in sterilità, i 20 ml di soluzione madre (4 inoculi per *N. oculata* ed altrettanti per *T. suecica* e per *I. galbana*).

Le colture nelle beute sono state esposte alla luce di 2 lampade al neon da 58 Watt ciascuna ed areate ininterrottamente inserendo al loro interno la pipetta da 1 ml già collegata precedentemente (tramite un tubicino in gomma provvisto di filtro da 0,45 micron) alla valvola dell'aerazione (attivata ininterrottamente).

La nuova concentrazione di partenza delle colture starter è stata calcolata sia per diluizione che determinata con la 'camera di Bürker' (considerando che i restanti ml di ogni madre nelle bottiglie, sono rimasti esposti alla luce ed a una temperatura di 19°-20°C per 24h).

#### **4.2.12 (a) Colture intermedie delle tre specie**

Avendo concentrazioni iniziali delle colture madri piuttosto basse si è optato per un volume starter delle colture di 100 ml.

Questo ha consentito di ottenere una maggiore concentrazione delle stesse prima di passare a volumi superiori; tuttavia dato che tale quantità (100 ml) non arrivava a riempire la beuta da 250 ml fino al punto di restringimento della stessa, fornendo così una superficie di evaporazione elevata (agevolata dall'aerazione e dall'assorbimento da parte del cotone idrofilo a chiusura della beuta), si è verificata una evaporazione iniziale delle colture che in fase di diluizione ha fatto sì che si aggiungessero volumi differenti in base alle singole evaporazioni.

Sono state perciò diluite le colture portandole a 200 ml (mantenendo le beute da 250 ml) tramite semplice aggiunta di differenti quantità di acqua, terreno e vitamine, nelle stesse proporzioni utilizzate in precedenza, a seconda del volume evaporato. Tutte le operazioni sono state sempre effettuate in sterilità. In alcuni casi, anche la pipetta monouso utilizzata per l'aerazione è stata sostituita, in presenza di cellule algali attaccate alla sua superficie.

I volumi da 200 ml non hanno evidenziato problemi di evaporazione.

La concentrazione è stata misurata precedentemente alla diluizione, grazie alla camera di Bürker mentre, successivamente alla stessa è stata calcolata avendo misurato (tramite un cilindro graduato) la quantità di acqua di mare (sterilizzata chimicamente o tramite UV) aggiunta in ogni beuta.

La nuova concentrazione per diluizione si può calcolare avendo a disposizione il volume iniziale ( $V_i$ ), il volume finale ( $V_f$ ) e la concentrazione algale iniziale ( $C_i$ ). Prima di tutto si calcola il numero totale delle cellule prese per la diluizione ( $N_c$ ) moltiplicando la  $C_i \times V_i$ .

A questo punto, il valore della concentrazione finale di cell/ml sarà :

$$C_f = N_c / V_f$$

Le colture sono mantenute alle stesse condizioni di temperatura, illuminazione e aerazione delle colture starter.

#### **4.2.12 (b) Colture intermedie delle tre specie**

Trascorsi 10 giorni circa, effettuando un ulteriore calcolo della concentrazione algale, date le concentrazioni sufficientemente elevate le alghe sono state trasferite in beute da 500 ml (*fig. 4.9*).

Si sono prelevati 100 ml per ogni coltura ed inoculati in 400 ml di terreno costituito da acqua di mare sterilizzata (chimica o UV), 2 ml di Guillard F/2 e 500  $\mu$ l di Vitamine, con le medesime procedure.

E' stata calcolata la nuova concentrazione considerando la diluizione 1:5.

Le colture sono state mantenute alle stesse condizioni di temperatura e luce, mentre è stata aumentata leggermente l'aerazione per compensare l'aumento dei volumi di coltura.

Inoltre è stata calcolata la concentrazione e verificato lo stato vitale delle colture madri mantenute alla luce, nelle provette da 5 ml. Le colture madri, sia alla luce che nel frigorifero erano sottoposte a periodiche agitazioni per rimettere le cellule in sospensione.

Successivamente sono state sterilizzate 3 beute da 250 ml, preparate con 160 ml di terreno (acqua sterilizzata chimicamente + 80µl di Guillard F/2 + 20µl di Vitamine) ed inoculate con 40 ml di colture madri ciascuna (8 provette da 5 ml per ciascun ceppo). Le beute contenenti le colture dei 3 ceppi algali sono state mantenute alle medesime condizioni di temperatura, aerazione e luce delle colture starter e non sono mai state supplementare di terreno per tutta la durata della coltura.

Questo allo scopo di costruire una curva di crescita totale fino alla fase di senescenza delle tre specie algali alle condizioni presenti presso il CRIAcq.

Le concentrazioni iniziali di tali colture, calcolate tramite la camera di Bürker erano:

<i>Tetraselmis suecica</i>	30.000	cell/ml
<i>Isochrysis galbana</i>	186.000	cell/ml
<i>Nannochloropsis oculata</i>	76.000	cell/ml

#### 4.2.13 Colture in bocce di vetro

Dopo 25 giorni dall'inoculo delle colture starter, date le concentrazioni sufficientemente elevate (in seguito ad una verifica della densità cellulare), si è effettuato l'inoculo in volumi più grandi, ovvero in palloni da 5 l (*fig. 4.10*).

E' stata pertanto effettuata una diluizione 1:10 ovvero i 500 ml di coltura (per ogni beuta) sono stati inoculati in 4.500 ml di terreno (acqua di mare sterilizzata con aggiunta di 25 ml di Guillard F/2 e 6,25 ml di vitamine); mantenendoci ancora una volta con un rapporto di diluizione più alto del classico passaggio di 250 ml di alghe in 4 l di terreno.

Ovviamente, precedentemente a tale operazione, i palloni sono stati sterilizzati chimicamente.

Le condizioni di allevamento sono state le medesime, ad eccezione di una maggiore vicinanza dei palloni alla luce rispetto alle beute e di una maggiore aerazione (massima).

Tali volumi sono stati fatti crescere per 27 giorni.

Le beute da 250 ml avviate allo scopo di costruire la curva di crescita sono state coltivate per 52 giorni.

Infine le varie specie algali, sono state posizionate, per tutta la durata della coltura, su piani differenti dell'apposito scaffale allo scopo di evitare il più possibile la contaminazione fra i ceppi.

#### 4.2.14 Analisi statistica

La significatività delle differenze tra i valori medi osservati durante le varie fasi sperimentali è stata valutata con il *t di Student* ponendo  $P < 0,05$  come limite di significatività. In particolare si sono valutati gli effetti del metodo di sterilizzazione sulle crescite microalgali e del metodo di depurazione biologica sul tenore di nitrati del pacchetto.

### 4.3 Caso studio: larvicoltura di rombo chiodato (*Psetta maxima*) allevato in mesocosmo

#### 4.3.1 Condizioni sperimentali

I cicli di larvicoltura (*fase di mesocosmo*) di *Psetta maxima* sono stati condotti in duplicato nell'impianto sperimentale a circuito chiuso del CRIAcq (Portici, Napoli) ( *fig. 4.11* ) mediante la tecnica dei mesocosmi che è una modificazione della tecnica dell'allevamento semi-intensivo, ovvero un circuito chiuso che prevede un rinnovo parziale di acqua tra il 10° - 15° giorno, in funzione del rispetto dei seguenti parametri:  $O_2 > 6$  ppm e  $NO_2 < 0,25$  ppm.

L'allevamento delle larve (densità di 5 larve/l) è stato condotto all'interno di 4 vasche di poliestere, rettangolari e con fuoriuscita centrale. Il volume totale di ciascuna vasca era di 2000 litri.

Le vasche erano dotate di vari punti di aerazione.

Le condizioni di luce prevedono un regime di fotoperiodo continuo (24 ore di luce) fino alla fine dello svezzamento, dopodiché il fotoperiodo scende a 16-18 ore di luce e 6-8 ore di buio.

Per quanto riguarda la qualità dell'acqua, viene utilizzata acqua sterilizzata e filtrata a 1  $\mu m$ .

Infine, è importante mantenere la temperatura dell'acqua nelle vasche a 18-20°C e una salinità pari al 35 ‰, dove tali parametri risultano essere quelli ottimali per la coltura larvale.

Naturalmente i parametri chimico-fisici furono valutati quotidianamente nelle vasche in cui sono state condotte le prove di schiusa sono stati: temperatura, pH, ossigeno disciolto e salinità. Con cadenza settimanale sono state condotte analisi spettrofotometriche per la determinazione di:  $NH_3$ ,  $NO_3^-$  e  $NO_2^-$  ( *fig. 4.12* ).

#### 4.3.2 Monitoraggio dei parametri di schiusa

Per verificare il corretto funzionamento del modulo adoperato per la schiusa delle larve di *Psetta maxima* è stato condotto, rispettivamente con cadenza giornaliera e settimanale, il monitoraggio dei parametri chimico-fisici e le analisi spettrofotometriche dell'acqua contenuta nelle vasche.

La determinazione della temperatura è stata effettuata mediante l'utilizzo del sensore termico del pH-metro (HACH sensION 156) e il sensore termico dell'ossimetro (OXYCON), immergendo le sonde direttamente nelle vaschette di prove di schiusa.

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 ioni  $H^+$  in eccesso andranno a legarsi all'ammoniaca formando lo ione ammonio ( $NH_4^+$ ), se invece il pH è alcalino (  $pH > 7$  ) 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 misurata mediante rifrattometro (Salt Refractometer Modello 106 ATC prodotto dalla SPER Scientific).

La concentrazione di ossigeno disciolto influenza direttamente sia le capacità autodepurative dell'acqua sia la possibilità di sopravvivenza della maggior parte delle specie microbiche e non. L'ossigeno disciolto viene misurato in continuo come mg di O<sub>2</sub>/L con un ossimetro OXYCON prodotto dalla CONNET.

Con cadenza settimanale sono state condotte le analisi spettrofotometriche, mediante l'utilizzo dello spettrofotometro HACH DR 2400, che hanno permesso la quantificazione della presenza dei seguenti composti: NH<sub>3</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

La ricerca dell'azoto ammoniacale è stata determinata spettrofotometricamente utilizzando il metodo del salicilato. Nel test Ammonia Salicylate l'ammoniaca libera reagisce con l'ipoclorito per formare monocloroammine. Le monocloroammine, a loro volta, reagiscono col salicilato in presenza di sodio nitro-ferricyanide per formare 5-amminosalicilato. Il sodio nitroprusside agisce poi come catalizzatore per l'ossidazione del 5-amminosalicilato a indosalicilato, un composto di colore blu. Il colore blu è mascherato dal colore giallo dovuto all'eccesso di reagente dando un colore finale verde.

L'intensità della colorazione è proporzionale all'ammontare di ammoniaca nel campione. Tale metodo permette di misurare l'ammoniaca libera e le monocloroammine.

Il test Ammonia Salicylate è stato condotto seguendo tale protocollo:

- aggiungere 2,0 ml di campione ad 1 Am Ver Diluent Reagent Test (questo è il campione preparato);
- aggiungere 2,0 ml di acqua libera da ammoniaca ad un altro Am Ver Diluent Reagent Test (questo è il bianco);
- aggiungere il contenuto di Ammonia Salicylate Reagent Powder Pillow ad entrambe le cuvette;
- aggiungere il contenuto di Ammonia Cyanurate Reagent Powder Pillow ad entrambe le cuvette;
- chiudere bene e miscelare fino al dissolvimento della polvere.

A questo punto inizia un periodo di reazione di 20 minuti.

Dopo la fase di azzeramento dello spettrofotometro con il campione bianco (libero da ammoniaca)

si effettua la lettura della concentrazione di azoto ammoniacale ad una lunghezza d'onda di 655 nm. I risultati vengono espressi in mg/l come  $\text{NH}_3$  e  $\text{NH}_3\text{-N}$ .

La ricerca dei nitriti viene effettuata mediante il metodo di diazotizzazione in quanto il nitrito presente nel campione reagisce con l'acido solfanilico per formare un sale di diazonio intermedio. Questo, a sua volta, si unisce con un acido "cromotropico" per produrre un complesso colorato di rosa che è direttamente proporzionale alla quantità di nitrito presente.

Per risultati più accurati si determina un valore per il bianco usando la stessa procedura con acqua deionizzata.

Il metodo di diazotizzazione è stato condotto secondo il seguente protocollo:

- Riempire un Test NitriVer 3 Nitrite con 5 ml di campione;
- Avvitare e miscelare fino al dissolvimento della polvere (questo è il campione preparato);
- Un colore rosa si svilupperà se il nitrito è presente;
- A questo punto inizierà un tempo di reazione di 20 minuti;
- Riempire un Test N Tube vial vuota con 5 ml di campione (questo è il bianco).

Dopo aver azzerato lo spettrofotometro con il campione bianco (campione non trattato) si effettua la lettura della concentrazione dei nitriti ad una lunghezza d'onda di 507 nm. I valori sono espressi come mg/l di  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ,  $\text{NaNO}_2$ .

La determinazione dei nitrati è stata effettuata attraverso il metodo della riduzione del Cadmio. Tale metodologia permette di ottenere una misura sensibile. Infatti il cadmio metallico riduce i nitrati del campione in nitriti; questi ultimi ioni reagiscono in un mezzo salicico con acido solfanilico per formare un sale intermedio di diazonio. Il sale si unisce con l'acido "gentistico" per formare una soluzione di colore ambrato. Poiché i nitriti risultano interferire con la determinazione dei nitrati a tutti i livelli, è stato necessario effettuare un pretrattamento del campione. Con tale pretrattamento si neutralizza l'interferenza dovuta ai nitriti presenti nel campione.

Il metodo della riduzione del cadmio è stato condotto secondo il seguente protocollo:

- Trattare il campione goccia a goccia con acqua bromica 30 g/l fino a quando una colorazione gialla persiste;
- Aggiungere 1 goccia di Phenol Solution 30 g/l fino alla scomparsa della colorazione gialla;
- Riempire una cuvetta con 10 ml di campione pretrattato;
- Aggiungere il contenuto di 1 NitraVer 5 Nitrate Reagent Powder Pillow;
- Inizia a questo punto un tempo di reazione di 1 minuto durante il quale bisogna agitare vigorosamente il campione;
- Dopo un periodo di reazione di 5 minuti si svilupperà una colorazione ambrata se è presente il nitrato.

- Riempire una seconda cuvetta con 10 ml di campione (questo è il bianco).

Dopo l'azzeramento dello spettrofotometro si effettua la lettura della concentrazione dei nitrati ad una lunghezza d'onda di 500nm. I risultati sono espressi in mg/l in diverse forme chimiche.

### 4.3.3 Allestimento dei mesocosmi

Le prove di svezzamento larvale dello *Psetta maxima* sono state condotte nel modulo generalmente adoperato per l'avannotteria per permettere una densità di 5 larve/l ottimale per evitare fenomeni di cannibalismo.

Il modulo utilizzato è costituito da quattro vasche ciascuna con capacità unitaria di 500 litri, dotate di sistemi di troppo pieno, di distribuzione e di raccolta acque con dispositivo di scarico.

Tale modulo è fornito di un proprio sistema di ricircolo.

Prima dell'allestimento dei mesocosmi le vasche sono state completamente svuotate, lavate, disinfettate con una soluzione d'ipoclorito di sodio al 5% e risciacquate abbondantemente.

Successivamente l'acqua utilizzata per riempire le vasche è stata prelevata dai pozzi di un'azienda ittica sita in località Ischitella (Caserta, Italia), in quanto ricca di ammoniaca (circa 5 ppm) e dunque funzionale alla maturazione rapida del filtro biologico per il trattamento delle acque e del mesocosmo stesso. L'acqua (salinità  $30 \pm 2$  ‰), prima di essere introdotta nella vasca, è stata filtrata con un filtro a cartuccia da 100  $\mu$ m.

Prima che le larve siano immesse nei mesocosmi, è necessario controllare che la densità degli organismi consumati dai pesci abbia raggiunto un'abbondanza sufficiente al loro sostentamento e che gli organismi zooplanctonici abbiano dimensioni consone all'alimentazione.

Venne garantita una concentrazione fitoplanctonica 250.000 cell/ml. La fioritura fitoplanctonica è necessaria sia al sostentamento della comunità zooplanctonica e quindi delle larve che alla pigmentazione. La pigmentazione è un processo con controllo neuro-endocrino nel quale interviene fondamentalmente la melanina. Questa è sintetizzata a partire dalla tirosina (Tyr) e dal suo precursore che è la fenilalanina (Phe): la deficienza di Phe o di qualche coenzima della reazione di formazione di melanina ad essere la causa di una cattiva pigmentazione, che non è indice di minore qualità.

Le larve (circa 10.000 al momento dell'arrivo), provenienti dalla Filiale Acquicola "Insuina" del Gruppo Pescanova presente nella Galicia (Spagna), sono state trasportate in taniche di plastica trasparente inserite in appositi scatoli di polistirolo con l'accortezza di mantenere la concentrazione di ossigeno superiore agli 8 mg/l e la temperatura a valori inferiori a 20 °C.

Una volta arrivate, le larve sono state poste nelle quattro vasche presenti nel modulo dell'avannotteria, dove tali vasche sono state adattate a mesocosmo.

La copertura dei fabbisogni giornalieri deve conciliare due principi opposti, quali:

- 1) assicurare la densità ottimale di prede per favorire la cattura da parte delle larve;
- 2) evitare che le prede rimangano a lungo nelle vasche prima di essere ingerite al fine di evitare una perdita di valore nutritivo.

Le modalità di distribuzione delle prede dipendono dalla tecnica di allevamento che normalmente viene definita in “acque verdi” (mesocosmo) o in “acque chiare”.

Nelle acque verdi, in cui coesistono alghe fitoplanctoniche e organismi zooplanctonici, che si nutrono delle precedenti, la densità di tali organismi è mantenuta costante. Questa tecnica è stata adottata nel corso delle prove di svezzamento larvale di *Psetta maxima* mediante l'impiego delle microalghe *Isochrysis galbana*. Abbiamo adoperato *Isochrysis galbana* per soddisfare le richieste nutrizionali di acidi grassi essenziali che sono molto elevate (1-2% del totale della dieta) per *Psetta maxima* a differenza delle specie ittiche tradizionali quali spigola e orata.

L'obiettivo è quello di ottenere un minimo di prede inutilizzate che rimangano nell'allevamento per il giorno successivo.

La tecnica in acque verdi, invece, permette di mantenere il valore nutritivo delle prede ad un livello relativamente soddisfacente poiché esse si alimentano dentro la vasca: tale fenomeno è vero e reale per i rotiferi, mentre il mantenimento della qualità nutritiva di *Artemia salina* è assicurata soprattutto dal tipo di distribuzione che può essere continua o frazionata.

#### **4.3.4 Il sistema a ricircolo**

##### **4.3.4.1 Il filtro meccanico**

Per permettere l'allontanamento del particolato grossolano, costituito essenzialmente da feci e mangime non consumato, le acque vengono inviate dal fondo della vasca ad una vasca di sedimentazione primaria.

La presenza di un semplice separatore centrifugo di solidi all'uscita diretta della vasca, poco efficace per la rimozione dei solidi fini, risulta comunque utile in quanto permette di limitare le operazioni di pulizia.

Dalla vasca di sedimentazione primaria l'acqua viene poi trasportata alla vasca polmone, dove mediante una pompa, è inviata ad un filtro meccanico a sabbia che garantisce l'allontanamento del 50-60% del particolato presente nell'acqua di allevamento.

Nell'impianto a circuito chiuso del CRIAcq, la scelta del filtro a sabbia più idoneo è stata effettuata prendendo in considerazione il peso degli animali ed il tasso di alimentazione. L'acqua una volta arrivata al filtro a sabbia, tramite un climatizzatore, viene termoregolata e inviata al filtro biologico percolatore e al filtro biologico galleggiante per permettere il completamento del ciclo di depurazione delle acque.

#### 4.3.4.2 La depurazione biologica

Il filtro biologico rappresenta il fulcro fondamentale della depurazione delle acque in quanto garantisce una resa di depurazione che si avvicina al 95 - 96 %.

Nell'impianto pilota a circuito chiuso del CRIAcq la biofiltrazione è garantita da:

- un filtro biologico percolatore;
- un filtro biologico sommerso a letto fluido.

Il sistema a filtro percolatore è un metodo aerobio di depurazione. Tale sistema consiste nell'inviare l'acqua di allevamento su un letto costituito da un mezzo filtrante di adatta pezzatura che nel nostro caso è rappresentato da spugne di poliuretano espanso e bioring con rapporto di almeno  $250 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Il percolatore, inoltre, è aerato controcorrente per permettere la liberazione della  $\text{CO}_2$ . Attraverso il mezzo filtrante l'acqua percola incontrando l'aria che sale controcorrente per tiraggio naturale. Questo favorisce la formazione di un film biologico di microrganismi aerobi sulla superficie stessa del mezzo, dove tali microrganismi sono deputati alla trasformazione delle sostanze organiche disciolte. Ed è proprio l'attività dei diversi batteri presenti a garantire il funzionamento del filtro biologico. I batteri, infatti, si nutrono delle sostanze organiche che, grazie ad un processo di ossidazione, trasformano in altri prodotti ricchi di energia che a loro volta servono come nutrimento di altri batteri. Generalmente, lo sviluppo di tali microrganismi avviene senza intervento esterno dopo un certo periodo di funzionamento del filtro, ma è anche possibile ricorrere all'impiego di speciali prodotti che permettono un rapido sviluppo delle colonie microbiche con conseguente abbreviazione dei naturali tempi di crescita batterica.

In condizioni di troppo pieno le acque da depurare passano al filtro biologico sommerso a letto fluido (Kaldnes Moving Bed).

Esso è riempito con materiali filtranti flottanti con densità pari a circa  $0,95 \text{ g}/\text{cm}^3$  e un rapporto superficie/volume pari a  $400 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Tali mezzi filtranti risultano ideali come supporto per tutti i ceppi biologici che compiono il ciclo dell'azoto. La crescita batterica avviene infatti grazie alla presenza di ossigeno, cibo e feci (ammoniaca e nitriti), mentre il materiale filtrante flottante fornisce la massima superficie per la colonizzazione dei batteri permettendo la formazione del film biologico ( *fig. 4.13* ) di microrganismi sulla superficie stessa del mezzo. La rigenerazione continua del biofilm è garantita dal movimento caotico del mezzo filtrante e flottante indotto mediante l'insufflazione di aria alla base della vasca che assicura il distacco dei microrganismi morti.

Tale mezzo filtrante non solo mantiene il biofilm giovane ed efficiente ma allontana anche l'anidride carbonica.

Il sistema di biofiltrazione permette quindi la realizzazione del processo di nitrificazione, ossia dell'ossidazione aerobica dei cataboliti azotati, ammoniaca e nitriti a nitrati ad opera di specifiche

colonie batteriche. I batteri coinvolti nel processo di nitrificazione, comunemente detti nitrificanti, sono batteri autotrofi chemiosintetici aerobi (batteri chemiolitotrofici) che ricavano gli elementi e l'energia necessaria al proprio metabolismo da fonti inorganiche quali lo ione ammonio (fonte di azoto e di idrogeno), i carbonati e bicarbonati (fonti di carbonio), acqua e aria (fonti di idrogeno).

Il processo ossidativo si svolge in due stadi come già accennato precedentemente. Lo ione prodotto, il nitrato, è uno ione relativamente innocuo e può accumularsi in acqua senza risultare tossico. Nonostante ciò è importante mantenere la sua concentrazione al di sotto dei 200 mg/l. Nel momento in cui la concentrazione dovesse superare il valore limite, lo ione nitrato può essere rimosso per diluizione, con parziale ricambio di acqua, oppure per riduzione anaerobica, con trasformazione dell'azoto nitrico in azoto gassoso ed acqua.

#### **4.3.5 Il protocollo alimentare adottato**

Per l'alimentazione larvale di *Psetta maxima* è stato seguito un protocollo specie-specifico che prevede:

- a. rotiferi somministrati dall'apertura della bocca fino al 15° giorno dalla nascita;
- b. naupli di artemia dal 15° al 20° giorno di vita;

I rotiferi, primo pasto offerto alle larve, sono stati coltivati adottando il sistema in discontinuo che consiste in successivi inoculi a partire dai ceppi madre in maniera tale da raggiungere rapidamente elevate densità. Tali organismi sono stati alimentati con 4 dosi giornaliere di lievito *Saccharomyces cerevisiae* (1 g/l miliardo di rotiferi) per poi essere arricchiti, 12 h prima della somministrazione, in *Isochrysis* (500 rot/ml, 4000 cel *Iso*/microlitro).

Dal 15° giorno di vita l'alimentazione a base di rotiferi è stata integrata aggiungendo naupli di artemia del ceppo AF ottenuti a partire dalle uova di artemia salina.

#### **4.4 L'impianto pilota a circuito chiuso**

L'impianto pilota a circuito chiuso, installato presso la stazione sperimentale di Salerno (*fig. 4.14*) del CRIAcq ( Centro Interdipartimentale di Ricerca per la Gestione delle Risorse Idrobiologiche e per l'Acquacoltura) dell'Università di Napoli e progettato con modelli produttivi per lo sfruttamento sostenibile ed eco-compatibile delle risorse acquicole campane, è strutturato in diversi moduli, ognuno dei quali svolge funzioni specifiche ed ha una propria autonomia strutturale e funzionale.

L'acqua una volta giunta all'impianto da due cisterne di 4000 l poste esternamente in un apposito container, viene filtrata e pompata (*fig. 4.15*) tramite condutture ai vari moduli, ognuno dei quali è fornito di filtri meccanici, filtri biologici e UV.

Sia i filtri meccanici (*fig. 4.16*) che quelli biologici variano da modulo a modulo e a seconda delle esigenze (100 micron, 50 micron o 10 micron); i filtri più fini da 10 micron sono utilizzati nelle fasi

più delicate di allevamento come la larvicoltura; le larve infatti non avendo ancora sviluppato il sistema immunologico risultano più vulnerabili.

Le lampade UV montate in numero variabile nei vari moduli hanno singolarmente una potenza di 25 watt a 2000 l/h.

L'impianto risulta formato come segue:

1. Un laboratorio
2. Una avannotteria ed impianto sperimentale per la valorizzazione maricoltura di specie marine mediterranee;
3. Uno schiuditoio per Molluschi Bivalvi;
4. Una struttura per la produzione massiva di Fitoplancton e Zooplancton;
5. Un impianto sperimentale per la valorizzazione maricoltura di Crostacei Decapodi;
6. Una sala gruppi elettrogeni, pompe e serbatoi per la stabulazione di grossi volumi di acqua di mare.

L'avannotteria è progettata in più moduli:

- stabulazione e condizionamento dei riproduttori, dotato di vasche circolari con volume di 10 m<sup>3</sup>
- pre-ingrasso.

Il 'modulo riproduttori' ( *fig. 4.17 a-b* ) è dotato di un sistema per la depurazione delle acque effettuata attraverso filtri meccanici (filtro a sabbia), biologici e lampade UV, che permettono l'abbattimento delle sostanze organiche, Batteri e Virus.

Il modulo a ricircolo per pre-ingrasso è costituito da vasche con capacità di 1000 litri ciascuna ( *fig. 4.17 c* ), mentre quello per le prove di schiusa e alimentazione larvale da vasche cilindriche a fondo conico in vetroresina rivestite di gel isoftalico alimentare.

Anche tale modulo è completamente autonomo ed è dotato di un proprio impianto di depurazione delle acque caratterizzato anche questo da un sistema articolato di filtri meccanici, biologici e lampade UV.

Il settore di allevamento Molluschi è costituito da quattro vasche, ciascuna con capacità unitaria di 1000 litri ( *fig. 4.18* ). L'acqua delle vasche di molluschicoltura subisce anch'essa un trattamento mediante filtri meccanici e lampade UV. Anche tale modulo è provvisto di filtro biologico.

Il modulo per la riproduzione ed emissione di uova di *Penaeus* è costituito da: vasche cilindriche in PVC per riproduttori a fondo sabbioso, vasche rettangolari in vetroresina per le post-larve e vasche troncoconiche in vetroresina per l'emissione delle uova. Anche tale modulo è provvisto di filtro biologico e UV ( *fig. 4.19* ).

Il modulo per la produzione di *Fito- e Zooplancton* ( *fig. 4.20* ) è costituito da:

1. Una scaffalatura in acciaio inox, su cui sono alloggiate beute e palloni di vetro della capacità di 10 l, illuminata da 5 gruppi di due lampade al neon fitostimolanti della potenza di 58 watt ciascuna;
2. Diversi supporti per sacchi in polietilene costituiti da: base di appoggio in vetroresina o plastificata e supporto di rinforzo verticale a maglie in ferro plastificato (*fig. 4.21* ).  
Ciascun sacco è esposto a due lampade al neon fitostimolanti montate verticalmente a fianco al supporto;
3. Zona dedicata alla sterilizzazione chimica dei materiali ed alla manipolazione delle colture.

Mediante una pompa l'acqua viene inviata a una serie di filtri a cartuccia, che presentano una capacità di filtrazione crescente da 60  $\mu\text{m}$  fino ad 1  $\mu\text{m}$ .



## Capitolo 5

### 5 Analisi dei risultati e discussione

#### 5.1 Ottimizzazione di colture fitoplanctoniche intensive per applicazioni produttive ecosostenibili ed ecocompatibili

##### 5.1.1 Organizzazione e gestione delle acque ricircuitanti: gestione delle acque a “pacchetti” (quantità definite di acqua ricircuitata differentemente trattata e stoccata per le differenti necessità del programma produttivo)

Nell’ambito delle linee di ricerca attivate stato determinato il *pacchetto* d’acqua trattata da produrre per ripristinare il medium di coltura per l’ottimizzazione delle colture fitoplanctoniche da utilizzare nei seguenti ambiti:

- Stabulazione e maturazione molluschi bivalvi (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Mytilus galloprovincialis*);
- Larvicoltura di rombo chiodato (*Psetta maxima*);

I fabbisogni giornalieri di microalghe sono stati calcolati dunque per

- l’avviamento e il mantenimento del mesocosmo;
- l’arricchimento dei rotiferi;
- la dieta dei bivalvi in fase di maturazione

Il periodo considerato era di circa 15 giorni, che corrisponde alla fase della larvicoltura svolta con la tecnica del *mesocosmo*, in cui le larve si alimentarono in un medium costituito da colture planctoniche (microalghe e rotiferi pre-arricchiti con microalghe *I.galbana*).

Il potenziale pacchetto è stato calcolato considerando una capacità produttiva massima potenziale di microalghe (*I. galbana*) di  $7 \cdot 10^6$  cell/ml.

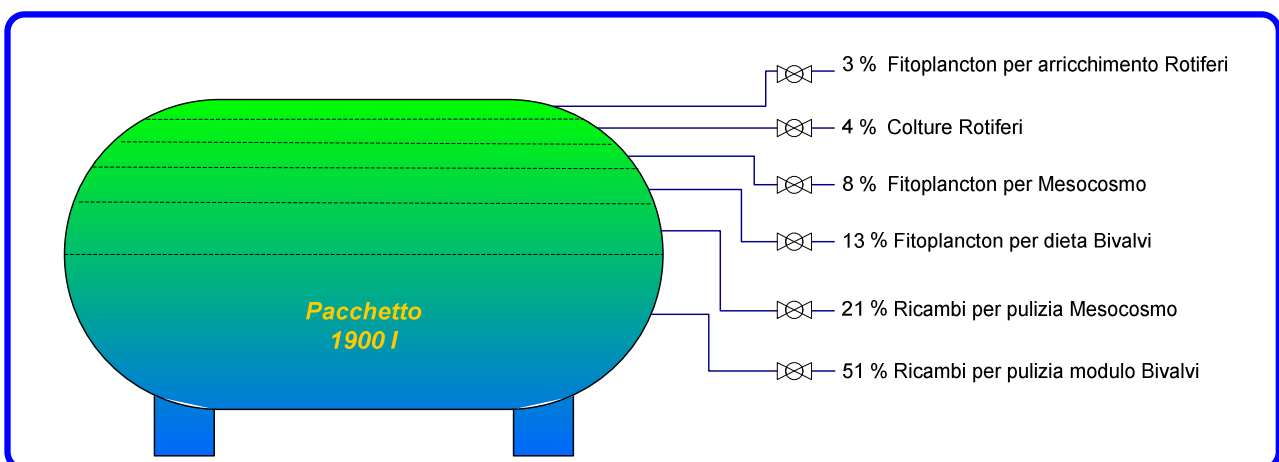


Fig. 5.1. Fabbisogni specifici di acqua sterile per la sperimentazione (pacchetto)

Il pacchetto giornaliero (fig. 5.1) da destinare alla produzione di *I. galbana* era di 126 l, di cui:

- 35,71 litri per il *mesocosmo*;
- 14,29 litri per l'arricchimento dei rotiferi;
- 60,0 litri per la dieta dei bivalvi adulti.

Per le colture dei rotiferi occorre inoltre 16,67 litri di medium sterile pronto all'uso.

Infine, per la necessità di effettuare la pulizia dei moduli di allevamento per la rimozione di escreti solidi, organismi morti, ecc. furono preventivati ricambi idrici giornalieri del 10 % del volume complessivo, ovvero:

- 100 litri per ricambi idrici del mesocosmo;
- 240 litri per ricambi idrici del modulo maturazione bivalvi adulti.

Il pacchetto giornaliero complessivo fu di 466 litri. il pacchetto. Tuttavia, per motivi gestionali (presenza di un unico modulo di trattamento fisico-biologico), i pacchetti di 4 giorni consecutivi venivano raccolti in una vasca di sedimentazione per poter essere poi avviati al trattamento fisico-biologico. Dunque il pacchetto complessivo ammontò a circa 1900 litri.

### 5.1.2 Trattamento meccanico-biologico delle acque del sistema a circuito chiuso e valutazione dei parametri chimici-fisici del refluo

Per la filtrazione fisica furono applicati due protocolli diversi a seconda della destinazione dell'acqua trattata:

- larve e fitozooplancton: 1  $\mu\text{m}$ ;
- stabulazione molluschi: 30  $\mu\text{m}$ ;

In particolare in tale fase è stata valutata l'efficienza della aggiunta di 20 l di scarto di produzione della microalga *Isochrysis galbana* (concentrazione di  $7 \cdot 10^6$  cell/ml).

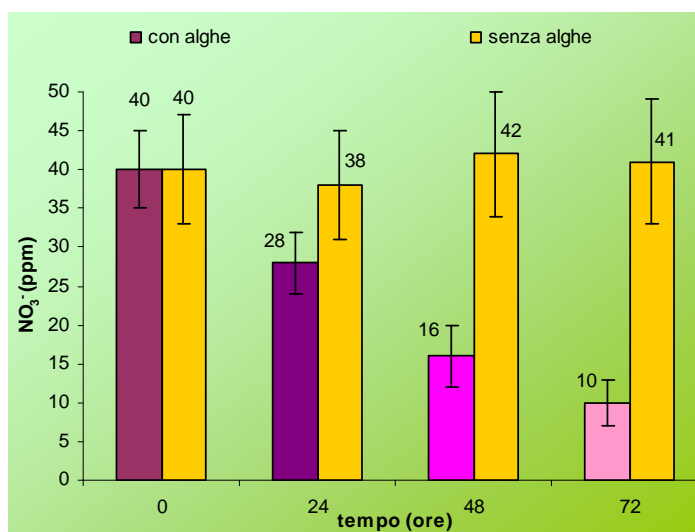


Figura 5.2. Variazione dei nitrati (ppm) durante il trattamento biologico in presenza e non di alghe

L'inoculo algale venne eseguito per migliorare l'efficienza del modulo di trattamento biologico per l'abbattimento dei nitrati stessi ( *fig. 5.2* ). Senza l'aggiunta di microalghe l'abbattimento di nitrati era praticamente nullo (40 ppm), mentre grazie all'aggiunta delle alghe è stato possibile ottenere un abbattimento fino a 15 ppm in 48 ore e 10 ppm in 72 ore.

Le differenze tra le medie osservate dei nitrati (ppm) presenti nei due sistemi sono risultate significative per tempi di trattamento di 24 ore ( $P < 0,05$ ) ed altamente significative ( $P < 0,01$ ) dopo 48 e 72 ore.

### **5.1.3 Colture algali per le finalità produttive prescelte in sistema a circuito chiuso. Ottimizzazione delle colture fitoplanctoniche in piccoli e medi volumi**

In tale fase si sono confrontati due differenti metodi di trattamento di sterilizzazione:

- fisico: U.V. per 96 ore;
- chimico: ipoclorito di sodio (300 ppm) per 24 h + 12 ore di neutralizzazione (areazione in presenza di tiosolfato).

Per ciascuna specie algale si è partiti da 'ceppi madre' conservati in bottiglie da 500 ml, con i quali sono state costituite 'colture starter' (diluite) da 100 ml, per arrivare a palloni da 5l, passando attraverso colture intermedie da 250 e 500 ml; ottenendo alla fine 12 palloni da 5l, ovvero 4 palloni per ceppo, divisi in: 2 con acqua di mare sterilizzata chimicamente e 2 con acqua di mare sterilizzata tramite U.V..

Ogni *step* ha richiesto in media dieci giorni per il raggiungimento della concentrazione ottimale all'inoculo successivo. La crescita dei ceppi algali, oggetto della sperimentazione, è stata monitorata tramite conta eseguita ogni 2 giorni.

Sono state inoltre avviate, a partire dai medesimi 'ceppi madre', tre beute da 250 ml, contenenti le tre differenti specie algali (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana* e *Nannochloropsis oculata*), al fine di costruire le curve di crescita delle suddette specie, nelle condizioni di laboratorio presenti presso l'impianto CRIAcq di Salerno.

I prelievi erano indispensabili per verificare l'aumento della concentrazione, dimensioni, stato vitale e di salute delle colture (motilità, presenza di organismi contaminanti o competitori).

Sono state inoltre controllate periodicamente le temperature sia esterne che interne ai volumi di coltura grazie ad appositi termometri.

Si è potuto constatare che, durante il periodo di sperimentazione, sebbene la temperatura ambientale calava leggermente durante la notte, le temperature nelle beute riuscivano a mantenere una buona media che rimaneva in un range accettabile di 21°-24°.

Di seguito sono riportati i risultati delle conte più significative, completati da figure che permettono di visualizzare graficamente i dati ottenuti.

### 5.1.3.1 Crescita di *T. suecica*: effetto dei metodi di sterilizzazione selezionati

Nel corso della sperimentazione i passaggi delle colture di *T. suecica* ( fig. 5.3 ) da piccoli a medi volumi sono avvenuti al 5° (da 100 ml a 200 ml), al 9° (da 200 ml a 500 ml) e al 33° (da 500 ml a 5 l) giorno

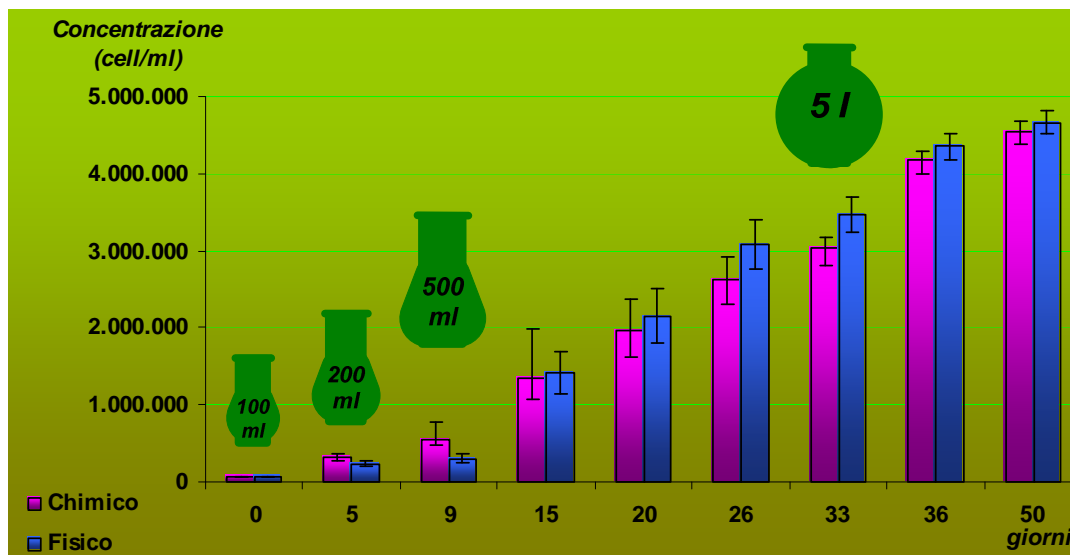


Figura 5.3. Crescita algale nel tempo di *Tetraselmis suecica* (da madre a boccione)

### 5.1.3.1 T1 Analisi delle differenze tra le concentrazioni per singoli volumi

Le tabelle sottostanti, i cui valori sono rappresentati graficamente, riportano medie e deviazioni standard (rappresentate sottoforma di barre di errore) delle concentrazioni di *Tetraselmis suecica* (nelle due modalità di sterilizzazione dell'acqua) raggruppate per i differenti volumi.

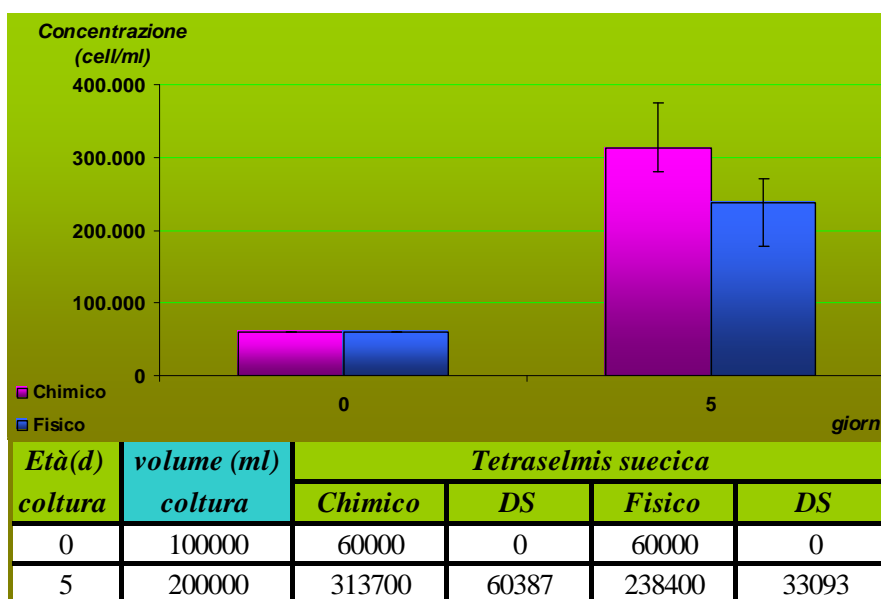


Figura 5.4. Concentrazioni di *T. suecica* in volumi di coltura di 100 e 200 ml

La crescita in questa prima fase è stata significativamente migliore ( $P < 0,05$ ) ai tempi 5 (fig. 5.4) e 9 (fig. 5.5) nelle colture in medium sterilizzato chimicamente. Dal 15° giorno in avanti fino alla cessazione della coltura si è osservata la tendenza a concentrazioni più elevate nelle colture di *T. suecica* in medium sterilizzato fisicamente.

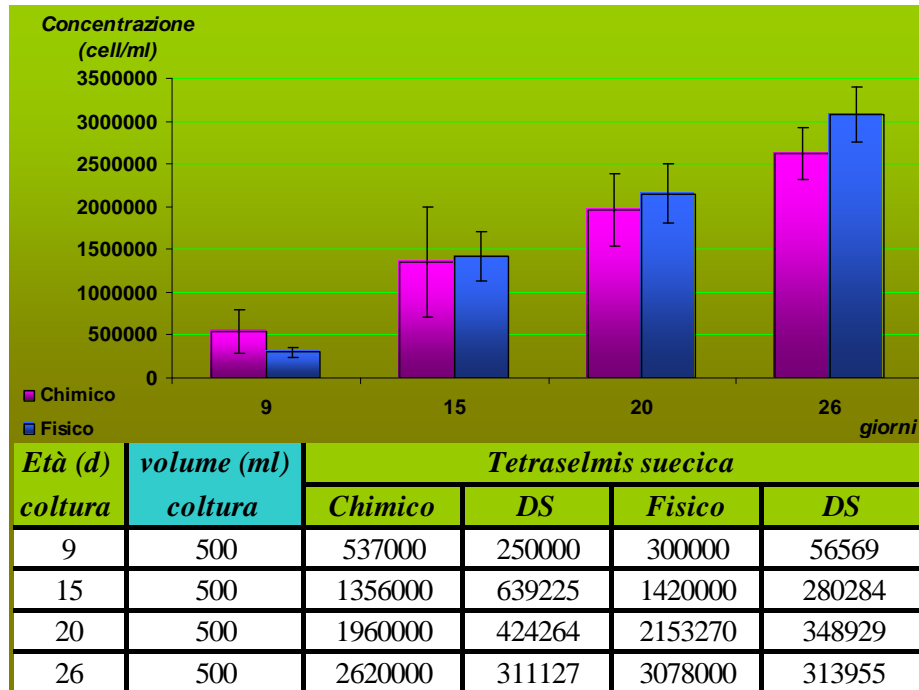


Figura 5.5. Concentrazioni di *T. suecica* in volumi di coltura di 500 ml

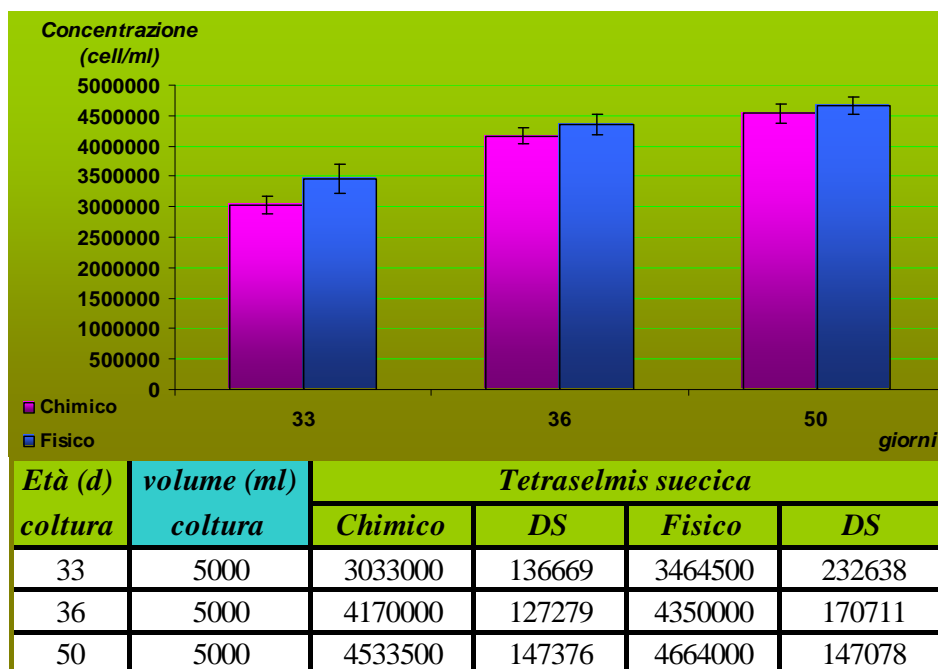


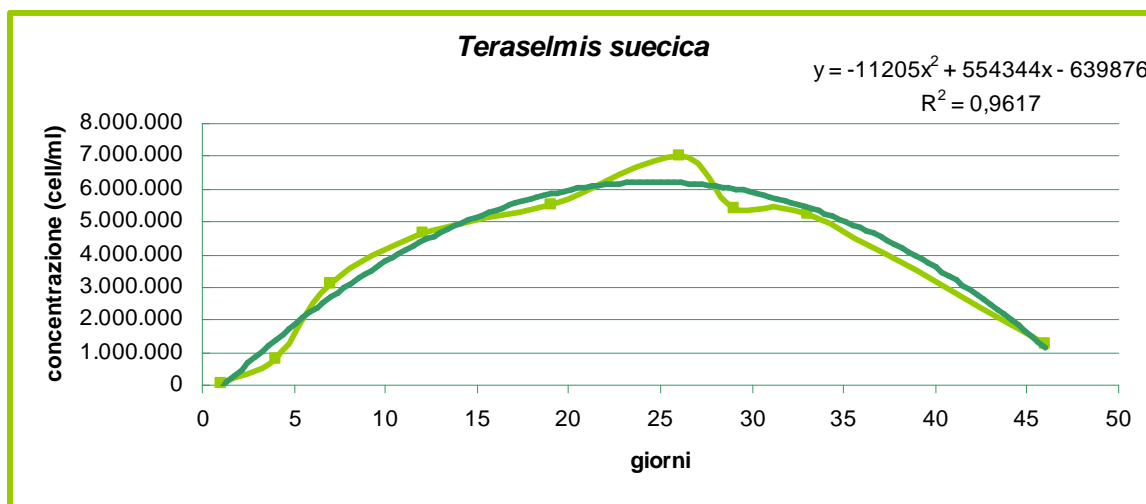
Figura 5.6. Concentrazioni di *T. suecica* in volumi di coltura di 5l

Per tempi di coltura di 26 giorni in beute da 500 ml ( *fig. 5.5* ) e 33 giorni in boccioni da 5 l ( *fig. 5.6* ) le colture allevate su terreno sterilizzato con raggi U.V. avevano concentrazioni nettamente superiori. Infatti le differenze tra gli effetti dei due metodi sulle concentrazioni di *T. suecica* erano significative rispettivamente per  $0,01 < P < 0,05$  e  $P < 0,01$ .

Tuttavia nella fase finale della coltura ( *fig. 5.6* ) tali differenze non sono risultate statisticamente significative.

### 5.1.3.1 T2 Curva totale di crescita di *Tetraselmis suecica*

Nella *figura 5.7* sono riportate le concentrazioni ottenute in volumi da 250 ml avviati in parallelo alle colture giunte a 5 l al fine di costruire una curva di crescita di controllo alle condizioni presenti al CRIACq di Salerno e partendo dalle soluzioni madri.



*Figura 5.7. Curva di crescita (valori osservati e valori stimati) di T. suecica*

Come è possibile constatare, *Tetraselmis suecica* ha avuto una crescita esponenziale fino ad un massimo di concentrazione di 7.040.000 cell/ml 26 giorni dopo l'inoculo delle beute. Successivamente si ha un leggero calo della concentrazione rientrando in una fase statica di circa 7 giorni seguita dalla fase di senescenza. Tale andamento risulta conforme con le tempistiche degli inoculi effettuati nelle colture oggetto di sperimentazione. Infatti tali inoculi, necessari al passaggio delle colture in volumi via via maggiori, sono stati effettuati in media ogni 10-20 giorni, a seconda dei volumi, ovvero a metà della fase di crescita esponenziale, quando le colture sono nel loro pieno vigore.

### 5.1.3.2 Crescita di *Isochrysis galbana*: effetto dei metodi di sterilizzazione selezionati

Nel corso della sperimentazione i passaggi delle colture di *I. galbana* ( fig. 5.8 ) da piccoli a medi volumi sono avvenuti al 2° (da 100 ml a 200 ml), al 5° (da 200 ml a 500 ml) e al 37° (da 500 ml a 5 l) giorno

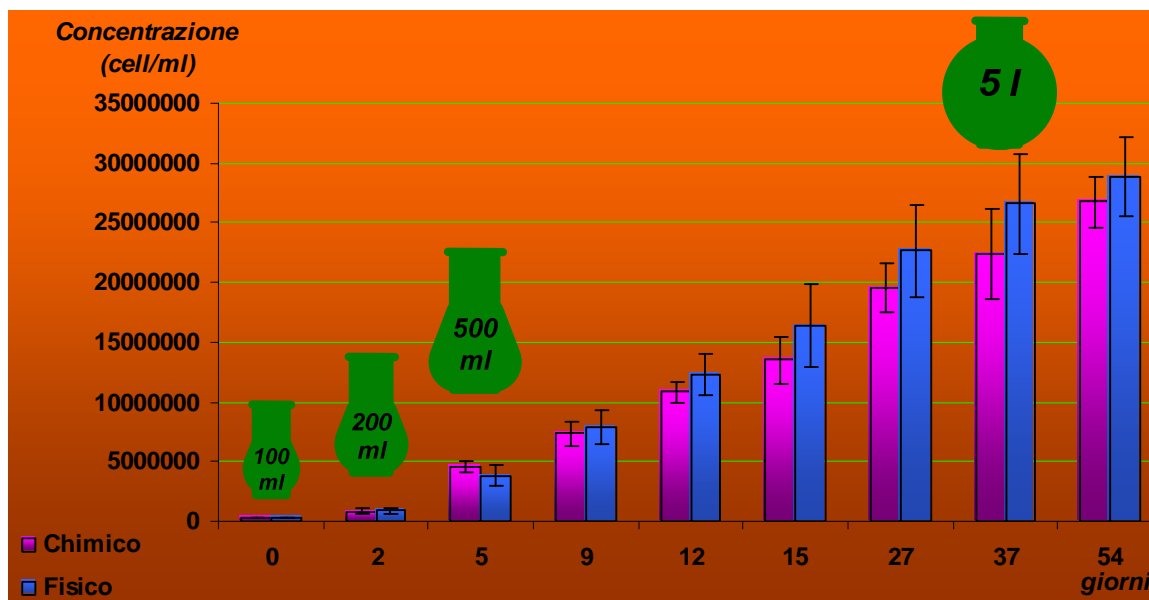
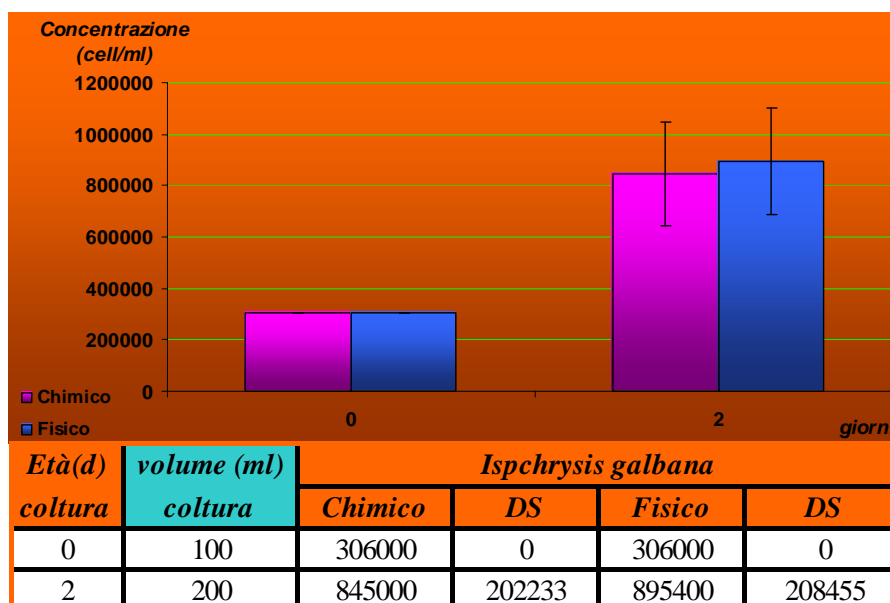


Figura 5.8. Crescita algale nel tempo di *Isochrysis galbana* (da madre a boccione)

### 5.1.3.2 II Analisi delle differenze tra le concentrazioni tra singoli volumi

Le tabelle sottostanti, i cui valori sono rappresentati graficamente, riportano medie e deviazioni standard (rappresentate sottoforma di barre di errore) delle concentrazioni di *Isochrysis galbana* (nelle due modalità di sterilizzazione dell'acqua) raggruppate per i differenti volumi.



Età(d) coltura	volume (ml) coltura	<i>Ispchrysis galbana</i>			
		Chimico	DS	Fisico	DS
0	100	306000	0	306000	0
2	200	845000	202233	895400	208455

Figura 5.9. Concentrazioni di *I. galbana* in volumi di coltura di 100 e 200 ml



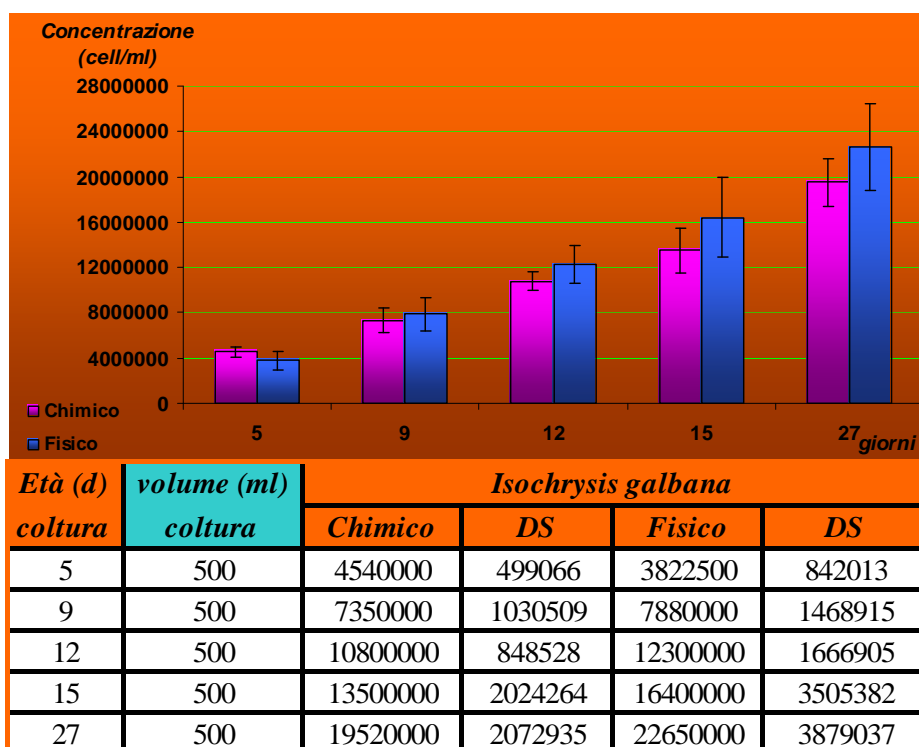


Figura 5.10. Concentrazioni di *I. galbana* in volumi di coltura di 500 ml

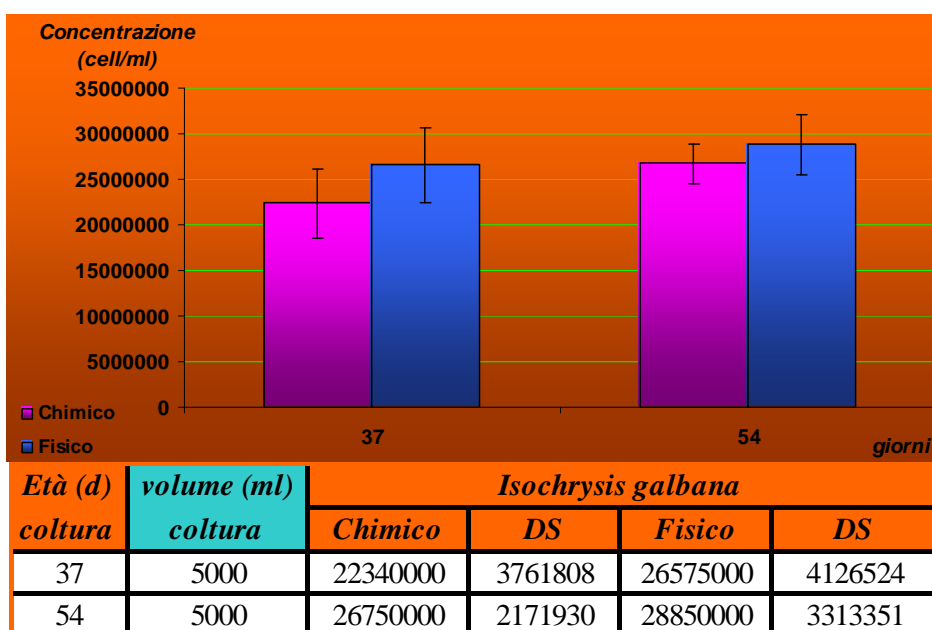


Figura 5.11. Concentrazioni di *I. galbana* in volumi di coltura di 5l

Dai dati rilevati emerge che le colture di *I. galbana*, in acqua sterilizzata tramite U.V. manifestano, per tutti i tempi di controllo ( fig. 5.9-5.10-5.11 ), tranne che al 5° giorno in beute da 500 ml ( fig. 5.10 ), la tendenza ad avere concentrazioni superiori rispetto alle colture allevate in acqua sterilizzata chimicamente, tuttavia le differenze non raggiunsero mai il limite di significatività ( $P >$

0,05).

### 5.1.3.2 I2 Curva totale di crescita di *Isochrysis galbana*

Nella figura 5.12. sono riportate le concentrazioni di *I. galbana* ottenute in volumi da 250 ml avviati in parallelo alle colture giunte a 5 l al fine di costruire una curva di crescita di controllo alle condizioni presenti al CRIAcq di Salerno e partendo dalle soluzioni madri.

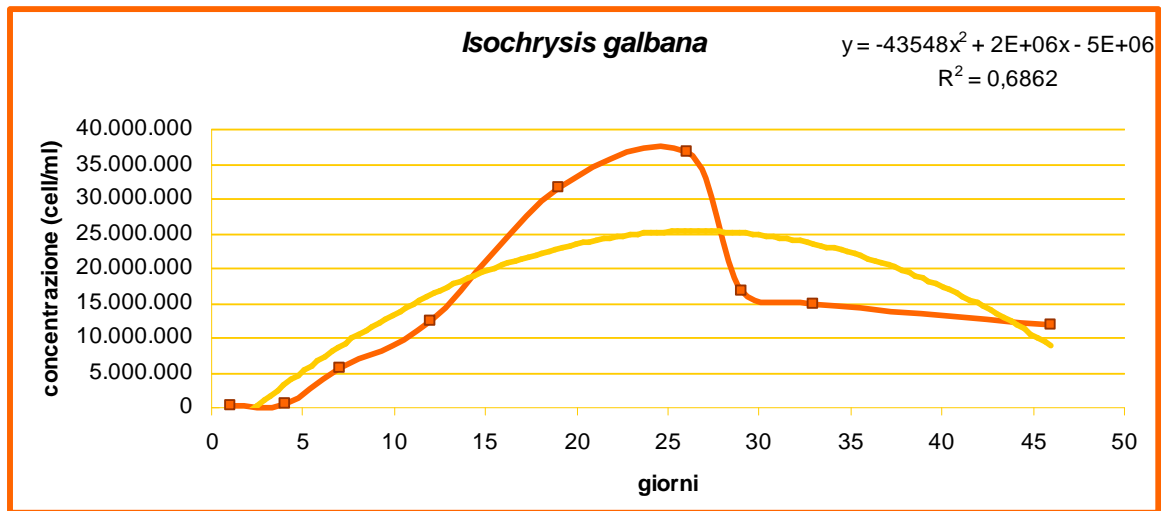


Figura 5.12. Curva di crescita (valori osservati e valori stimati) di *I. galbana*

Come è possibile constatare dal grafico, alle condizioni ambientali dell'allevamento, *Isochrysis galbana* ebbe una fase esponenziale che terminò intorno al 26° giorno dall'inoculo, raggiungendo una concentrazione massima di 36.864.000 cell/ml. Successivamente si ebbe una caduta a 16.650.000 cell/ml e una fase stazionaria di 17 giorni che precedette la fase di senescenza della coltura. Alcuni autori riportano in tale fase un picco nella produzione algale, seguito da piccola caduta prima di stabilizzarsi alla successiva fase stazionaria.

Tale andamento risulta conforme con le tempistiche degli inoculi effettuati nelle colture oggetto di sperimentazione. Infatti gli inoculi delle colture dalle beute di 500 ml (fase principale del ciclo) ai boccioni da 5 l superiori furono effettuati il 27° giorno ovvero ancora nella fase di crescita esponenziale, quando le colture sono nel loro pieno vigore.

### 5.1.3.3 Crescita di *Nannochloropsis oculata*: effetto dei metodi di sterilizzazione selezionati

Nel corso della sperimentazione i passaggi delle colture di *Nannochloropsis oculata* (fig. 5.13) da piccoli a medi volumi sono avvenuti al 2° (da 100 ml a 200 ml), al 5° (da 200 ml a 500 ml) e al 37° (da 500 ml a 5 l) giorno.

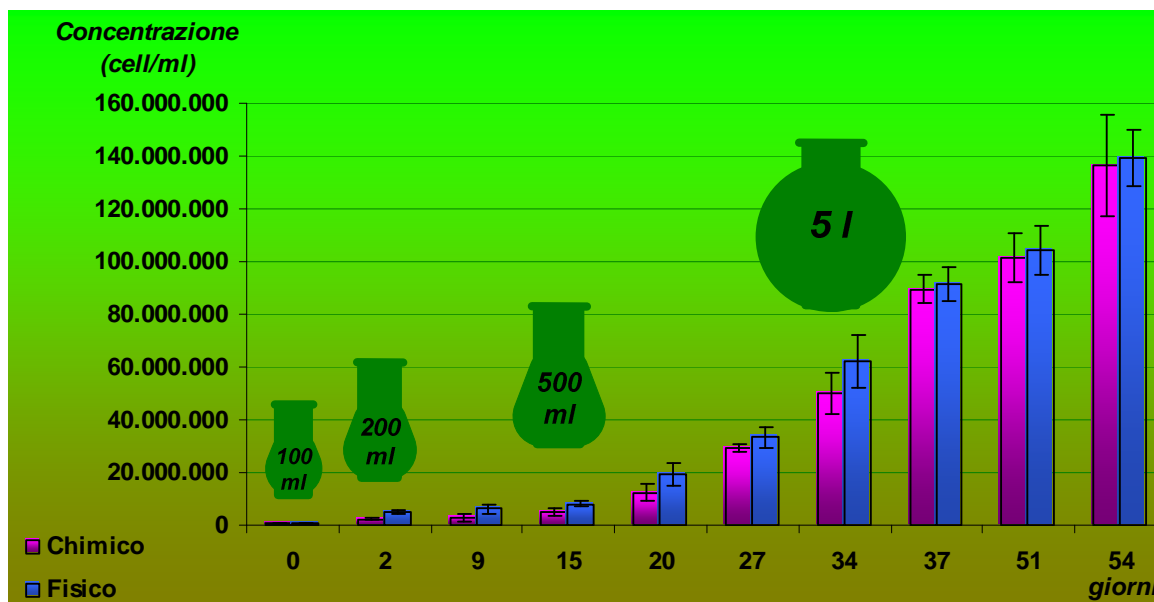


Figura 5.13. Crescita algale nel tempo di *Nannochloropsis oculata* (da madre a boccione)

### 5.1.3.3 N1 Analisi delle differenze tra le concentrazioni tra singoli volumi

Le tabelle sottostanti, i cui valori sono rappresentati graficamente, riportano medie e deviazioni standard (rappresentate sottoforma di barre di errore) delle concentrazioni di *Nannochloropsis oculata* (nelle due modalità di sterilizzazione dell'acqua) raggruppate per i differenti volumi.

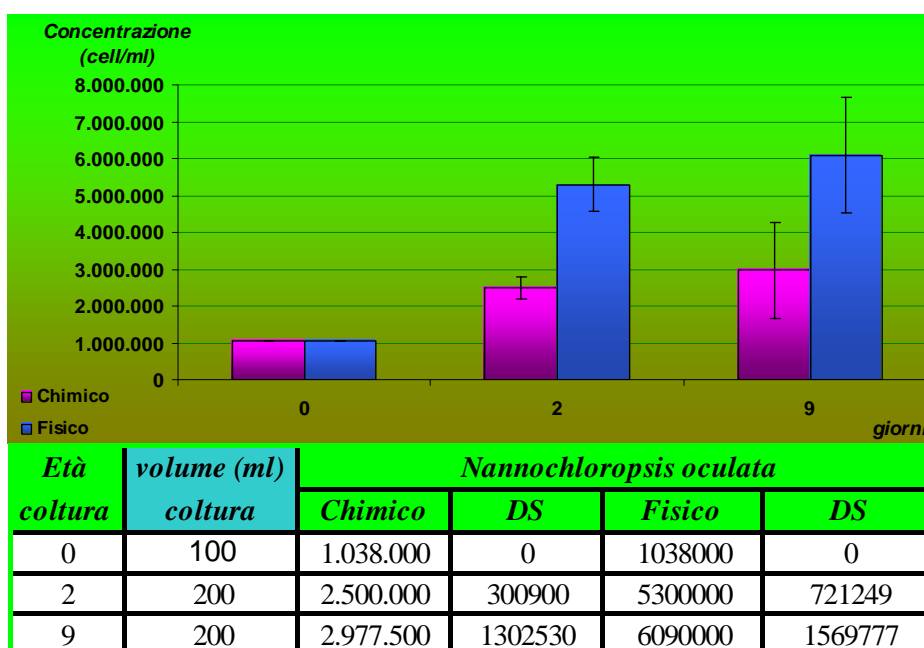


Figura 5.14. Concentrazioni di *N. oculata* in volumi di coltura di 100 e 200 ml

Diversamente da quanto rilevato per le colture delle altre due microalghe, *Nannochloropsis oculata* mostrò in modo più evidente gli effetti del metodo di sterilizzazione del refluo sulla crescita colturale fitoplanctonica.

In particolare per i piccoli volumi da 100 e 200 ml ( *fig. 5.14* ) e medio-piccoli da 500 ml fino all'età di 20 giorni ( *fig. 5.15* ) le differenze erano altamente significative ( $P \leq 0,01$ ).

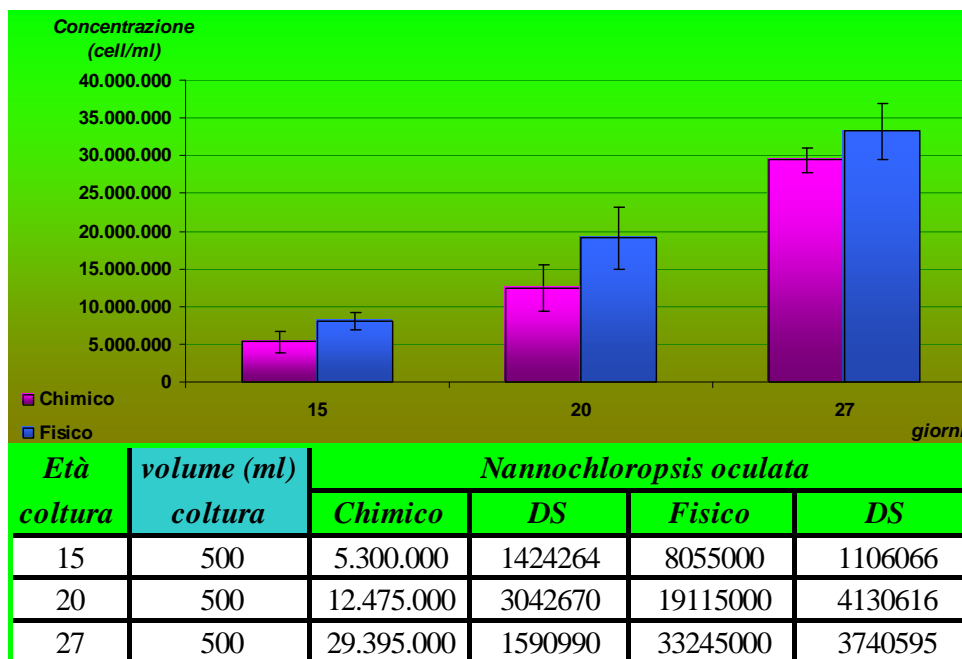


Figura 5.15. Concentrazioni di *N. oculata* in volumi di coltura di 500 ml

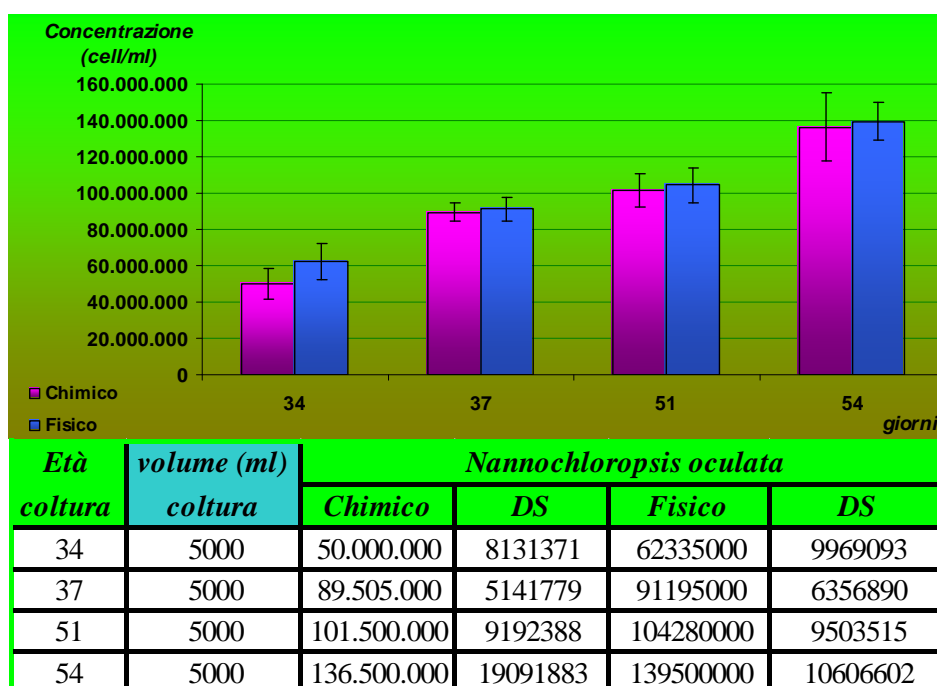


Figura 5.16. Concentrazioni di *N. oculata* in volumi di coltura di 5l

Ai tempi di 27 e 34 giorni, per le colture da 500 ml (fig. 5.15) e 5 l (fig. 5.16) rispettivamente le differenze furono ancora significative ( $0,01 \leq P \leq 0,05$ ), ma nei volumi medi (bocconi da 5 l) da subito, fermo restando la maggiore concentrazione delle alghe cresciute su medium sterilizzato fisicamente, le differenze si annullarono quasi del tutto.

### 5.1.3.3 N2 Curva totale di crescita di *Nannochloropsis oculata*

Nella figura 5.17 sono riportate le concentrazioni di *N. oculata* ottenute in volumi da 250 ml avviati in parallelo alle colture giunte a 5 l al fine di costruire una curva di crescita di controllo alle condizioni presenti al CRIAq di Salerno e partendo dalle soluzioni madri.

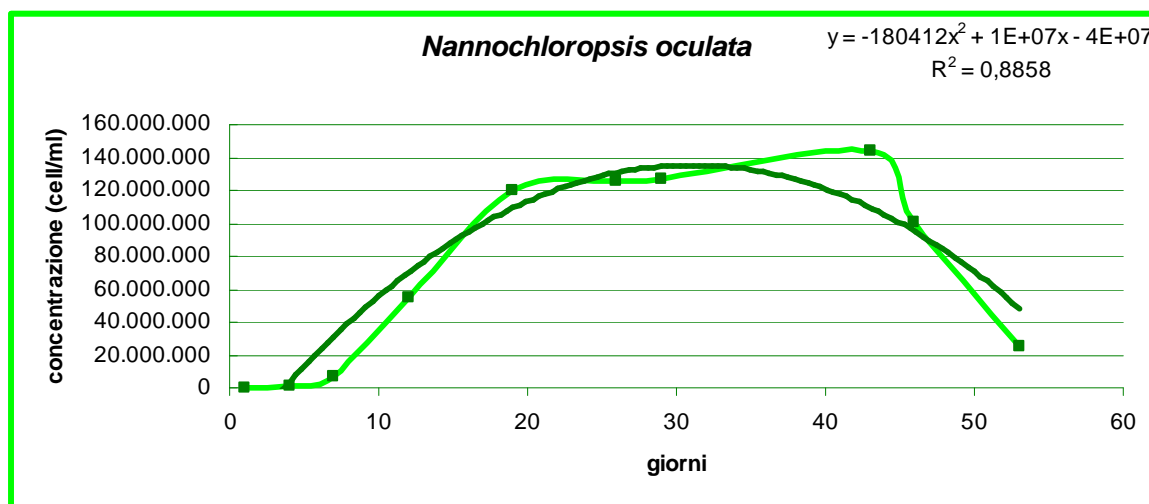


Figura 5.17. Curva di crescita (valori osservati e valori stimati) di *N. oculata*

Come è possibile constatare dalla figura 5.16, alle condizioni di allevamento programmate, *Nannochloropsis oculata* ha avuto una crescita esponenziale terminata al 19° giorno dall'inoculo con un picco di concentrazione cellulare (120.280.000/ml). Successivamente la concentrazione continuò ad aumentare anche se molto lentamente (transizione tra la fase esponenziale e stazionaria) fino ad un massimo di 144.000.000 cell/ml (43° giorno), seguita dalla fase di caduta della coltura. Anche se tale curva presentò un andamento atipico, è da tenere presente che, benché le curve di crescita abbiano un andamento suddiviso in tre fasi principali, tali curve possono variare a seconda delle condizioni specifiche di allevamento.

Comunque tale andamento risulta conforme con le tempistiche degli inoculi nelle colture oggetto di sperimentazione: questi furono effettuati dopo 13 e 19 giorni (a seconda dei volumi), ovvero durante la log fase, ovvero nel pieno vigore replicativo cellulare.

Nonostante una tendenza generale verso una crescita superiore delle colture algali nel mezzo sterilizzato tramite raggi U.V., statisticamente significativa per la maggior parte del ciclo di

*Nannochloropsis oculata*, per le altre due specie complessivamente non sono state rilevate molte differenze significative tra le colture in acqua sterilizzata con il metodo chimico (300 ppm di ipoclorito di sodio) e con il metodo fisico (96 ore UV).

Per tale motivo i raggi U.V. sono sicuramente una buona alternativa alla classica sterilizzazione chimica dell'acqua utilizzata nelle produzioni algali, soprattutto considerato che l'obiettivo è operare in sistemi totalmente chiusi.

Ciò è ancora più importante negli impianti a circuito chiuso per vari motivi:

- evitare ulteriori costi di gestione (candeggina e tiosolfato);
- recuperare il tempo che il personale dedica alle procedure di sterilizzazione chimica dell'acqua;
- i raggi U.V. risultano molto pratici e sicuri poiché danno la possibilità di avere a disposizione, in continuo, acqua da destinare alle colture algali, senza dover attuare, più volte nella stessa giornata, le procedure per la sterilizzazione chimica e l'allontanamento del cloro residuo, eventi dipendenti dall'impiego di prodotti chimici.

Data la stretta dipendenza del sistema a circuito chiuso dall'energia, è auspicabile un ulteriore sforzo per l'ottimizzazione delle produzioni fitoplanctoniche, quale l'impiego di fonti energetiche alternative e rinnovabili (sistemi fotovoltaici o eolici) accoppiate a nuove tecnologie che riducano le esternalità negative e siano così ecosostenibili ed ecocompatibili.

#### **5.1.4 Ottimizzazione protocolli di sterilizzazione per i grandi volumi e valutazione dei parametri microbiologici**

In tale fase si è eseguita l'applicazione dei protocolli di sterilizzazione, precedentemente testati sui piccoli e medi volumi, per produzioni di biomasse algali su scala pilota. In tal caso venne seguita la crescita in grandi volumi (fotobioreattori flessibili in PE) di *I. galbana*, in quanto è la microalga più ampiamente utilizzata sia nella molluschicoltura che nelle larvicoltura di specie ittiche e non solo. Poiché non vi furono differenze significative tra le crescite microalgali sui due medium differentemente sterilizzati, si stabilì di riutilizzarli entrambi e aggiungerne altri due misti (fisico + chimico). Alla base di questa decisione vi furono due motivazioni di ordine gestionale:

- man mano che le lampade U.V. vengono utilizzate, la potenza di sterilizzazione diminuisce fino ad annullarsi tra le 10.000 e le 20.000 ore di utilizzo (i produttori consigliano il cambio dopo 10.000 ore di funzionamento);
- l'utilizzo di ipoclorito alla concentrazione di 300 ppm aumenta i rischi di bioaccumulo negli organismi, considerando il fatto che si è deciso di operare in sistema a circuito chiuso e su grandi volumi.

Per tal motivo si decise di congiungere le due metodiche provando due tempi diversi di

sterilizzazione con raggi U.V. combinati con un trattamento chimico più blando (100 ppm).

Nel corso della seguente fase furono così confrontati i seguenti 4 protocolli di sterilizzazione:

- I. 24 ore 300 ppm ipoclorito + 12 ore neutraliz. (= 36 ore chimica)
- II. 96 ore U.V.
- III. 48 ore U.V. + 36 ore chimica (100 ppm)
- IV. 96 ore U.V. + 36 ore chimica (100 ppm)

Le valutazioni microbiologiche dell'acqua furono eseguite a vari stadi del trattamento e furono determinate le curve di crescita di *Isochrysis galbana* coltivata in grandi volumi nel medium diversamente trattato. I parametri microbiologici vennero analizzati col metodo dell'inclusione in PCA.

Con il trattamento fisico si raggiunsero le  $5 \pm 5$  UFC dopo 96 ore (fig. 5.18). La sterilità completa (0 UFC) veniva raggiunta con i protocolli I (24 ore), III (84 ore) e IV (132 ore).

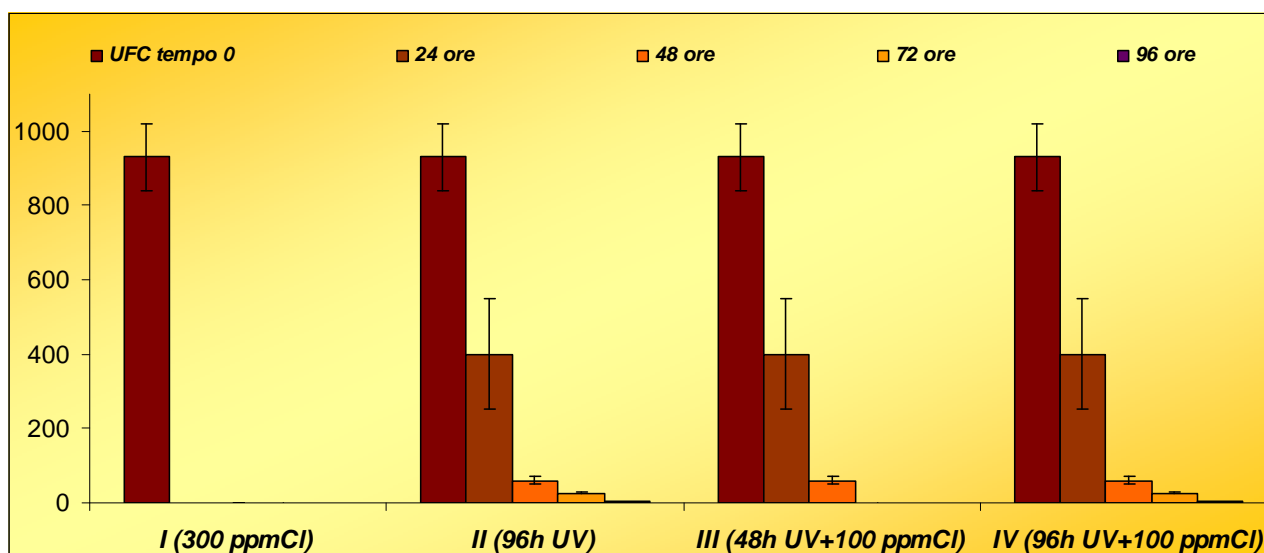


Figura 5.18. Variazioni della carica batterica in funzione del tempo e dei diversi metodi di sterilizzazione

Si è dunque seguita la curva di crescita dell'alga *Isochrysis galbana* fino al plateau, ovvero fin oltre la fine della fase esponenziale.

In termini di massima concentrazione cellulare raggiunta (fig. 5.19), non vi furono differenze significative tranne che nelle fasi iniziali tra i metodi I e II (migliore) e in alcuni controlli intermedi nel confronto tra il II (migliore) e IV. Tra i protocolli II e III non vennero mai riscontrate differenze significative.

Inoltre col protocollo I veniva raggiunta la concentrazione di circa  $9,5 \pm 1,5 * 10^6$  cell/ml dopo 9 giorni di coltura in un fotobioreattore da 100 l partendo da circa  $1,0 * 10^6$  cell/ml, mentre i restanti protocolli raggiungevano concentrazioni simili con un giorno di ritardo.

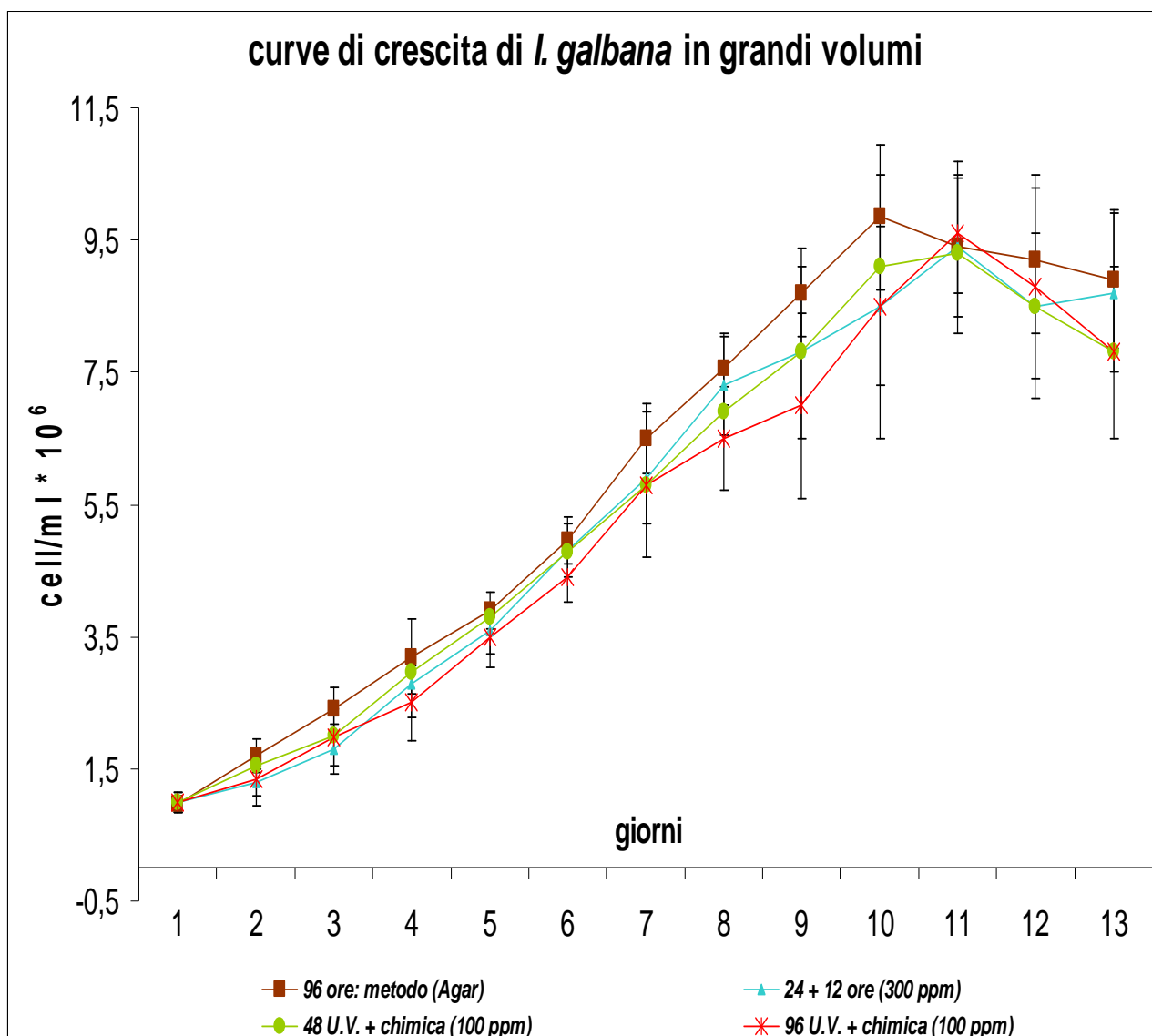


Figura 5.19. Curve di crescita di *I. galbana* in funzione dei diversi metodi di sterilizzazione

Protocolli di sterilizzazione	<i>I. galbana</i>		tempo di gestione (d) (sterilizzazione + coltura)
	max conc.	tempo (d)	
<b>chimica (300 ppm ipocl.)</b>			
I. 24 ore + 12 ore neutr.	$9,35 \pm 1,6 * 10^6$ cell/ml	10	12,5
<b>fisica (U.V)</b>			
II. 96 ore	$9,45 \pm 1,4 * 10^6$ cell/ml	9	13
<b>congiunta (fisica + chimica 100 ppm)</b>			
III. 48 ore + 36 ore	$9,2 \pm 1,7 * 10^6$ cell/ml	10	12,5
IV. 96 ore + 36 ore	$9,6 \pm 1,3 * 10^6$ cell/ml	10	14,5

Fig. 5.20. Tempo di gestione di *I. galbana* in base al metodo di sterilizzazione

Considerando i dati esposti nella figura 5.20, possiamo affermare che:



I. Sebbene i tempi di gestione (tempi di trattamento di sterilizzazione + tempi di crescita) della coltura siano i più brevi, il trattamento con ipoclorito di sodio alla concentrazione di 300 ppm per 24 h + 12 ore per la neutralizzazione (36 ore totali), comporta un utilizzo eccessivo di ipoclorito di sodio che non è una pratica che rispetta il principio dell'ecocompatibilità. La prova è stata compiuta per valutare eventuali vantaggi significativi che si fossero verificati in termini produttivi. Tali benefici però non si realizzarono, infatti la crescita algale era in linea con quella degli altri protocolli in termini di concentrazione massima raggiunta, ma tale obiettivo veniva raggiunto con almeno 24 ore di ritardo

II. Il trattamento con U.V. per 96 ore garantiva tempi di crescita più rapidi. La mezza giornata in più necessaria per la gestione integrale del protocollo era ampiamente ripagata dalla possibilità di svincolarsi dall'impiego di sostanze chimiche in sistemi a circuito chiuso;

III. Il trattamento congiunto breve ha dato i più brevi tempi di gestione, garantendo un livello di concentrazione di biomassa simile a tutti gli altri protocolli e il ricorso a prodotti chimici in misura molto più blanda. È sicuramente una valida alternativa al metodo fisico durante lo stadio di decadimento della potenza di sterilizzazione delle lampade U.V.;

IV. Tale trattamento aggiunse soltanto 48 ore di trattamento U.V. (con i costi che ne derivano), a fronte di nessun vantaggio in termini di crescita e velocità,

Considerando i risultati positivi ottenuti, sia in termini di velocità di crescita che di biomassa prodotta, si è stabilito di applicare la metodica fisica di produzione di *I. galbana* da reflui trattati nella seconda parte della ricerca.

Il caso studio affrontato, la larvicoltura di *Psetta maxima*, è estremamente importante in quanto il successo di una produzione ittica è fortemente dipendente dal tasso di sopravvivenza delle larve nelle prime fasi di allevamento (pre-svezzamento), che a sua volta è fortemente condizionata dalla disponibilità di zooplancton, ma soprattutto fitoplancton sia in termini di qualità che quantità.

Grazie a questi risultati, ovvero alla possibilità di produrre *I. galbana* a concentrazioni di circa  $9,5 \cdot 10^6$  cell/ml, il solo pacchetto da destinare quotidianamente alla produzione algale in un impianto pilota a regime (larvicoltura + molluscoltura) come descritto precedentemente, calò da 126 l a 93 l, ovvero del 27%.

## 5.2 Caso studio: larvicoltura di rombo chiodato (*Psetta maxima*) allevato in mesocosmo

La sperimentazione si è posta l'obiettivo di individuare le modalità di svezzamento larvale di *Psetta maxima* all'interno di un impianto a circuito chiuso. Le piccole larve, circa 10.000 al momento dell'arrivo, provenivano dalla Filiale Acquicola "Insuina" del Gruppo Pescanova (Galicia, Spagna) dove *Psetta maxima* rappresenta una delle principali specie ittiche allevate.

Lo scopo era allevare le larve (densità 5 larve/l) da una taglia iniziale di 3 mm e peso pari a 0,1 - 0,2 mg fino alla fase di passaggio dall'alimentazione a rotiferi (fase dipendente dalla biomassa fitoplanctonica) a quella ad artemie.

Per tutto il tempo della sperimentazione fu eseguito il monitoraggio ed il controllo dei parametri chimico-fisici (fig. 5.21) quali temperatura ambientale, salinità, pH, ammoniaca, nitriti e nitrati.

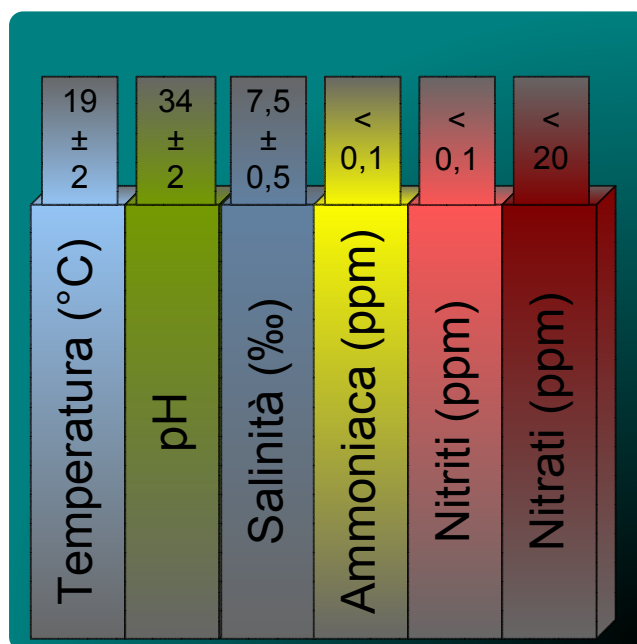


Fig. 5.21. Valori medi e deviazione standard dei principali parametri chimico-fisici considerati

Per soddisfare i fabbisogni nutrizionali di acidi grassi essenziali, molto elevati per le larve di *Psetta maxima*, sono state utilizzate le microalghe brune della specie *Isochrysis galbana*. Tali microalghe, addizionate al mezzo acquoso del mesocosmo, sono servite come nutrimento per i rotiferi, organismi zooplanctonici di cui le piccole larve si sono cibate dal 4° fino al 15° giorno di vita (fig. 5.22). Le microalghe sono state prodotte con terreni di coltura ricircuitati e sterilizzati con raggi U.V. secondo le modalità selezionate nelle fasi precedenti della ricerca. Anche i rotiferi furono allevati in acque ricircuitate e sterilizzate secondo le stesse modalità.

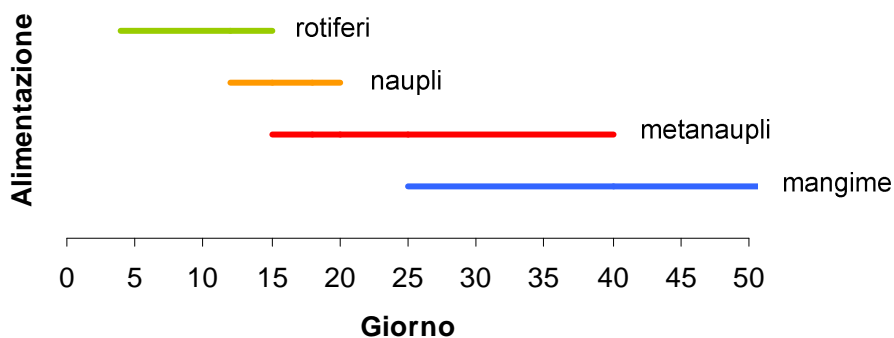


Figura 5.22. Dieta di *Psetta maxima* nei primi stadi di vita

I rotiferi inoculati per l'avviamento del mesocosmo ( fig. 5.23 ) furono circa 2000/larva e quelli integrati durante il mantenimento del mesocosmo sono stati circa 9600/larva mediamente presente nel corso dei 15 giorni. Il valore di 11600 rot/larva soddisfa ampiamente i fabbisogni contemplati in letteratura di 10000-12000 rotiferi/larva nel corso dell'intera fase di *mesocosmo*. Il successo delle produzioni zooplanctoniche fu legato ad un altro successo, ovvero l'ottenimento di produzioni algali in sistema a circuito chiuso. Grazie alle metodiche applicate in tale caso studio fu possibile integrare le oltre  $1,5 \cdot 10^6$  cell/ml di *Isochrysis galbana* con meno dei 35,71 l/d e precisamente con 27,14 l (-22%).

#### Mesocosmo

Larve di <i>Psetta maxima</i>		<i>Isochrysis galbana</i> (cell/ml)		Rotiferi (rot/ml)			<i>Artemia</i> (naupli/larva)
Giorni	Sopravvivenza	presenze	integrazione	1° pasto	2° pasto	integrazione	
0							
1		250.000	0				
2	10000 100,0%	250.000	0				
<b>Sistemazione di 10.000 larve di rombo nell'avannotteria (densità 5 larve/l)</b>							
3	8.790 87,9%	250.000	0	10	10	0	
4		250.000	0	9	5	5	
5		120.000	130.000	8	6	4	
6		110.000	140.000	7	3	7	
7	8560 85,6%	68.000	182.000	7	5	5	
8		156.000	94.000	7	5	5	
9		154.000	96.000	8	5	5	
10		98.000	152.000	6	3	7	
11		90.000	160.000	7	6	4	
12	7820 78,2%	55.000	195.000	7	2	8	
13		36.000	214.000	6	3	2	5
14		196.000	54.000	5	4	1	5
15	7440 74,4%	122.000	130.000	5	5	0	5
		<b>totale</b>	<b>1.547.000</b>	<b>totale</b>		<b>53,00</b>	

Fig. 5.23. Valori medi e dev. st. dei principali parametri chimico-fisici considerati

Le larve di rombo erano misurabili dal 10° giorno. La lunghezza al 15° giorno era di circa 6-7 mm.

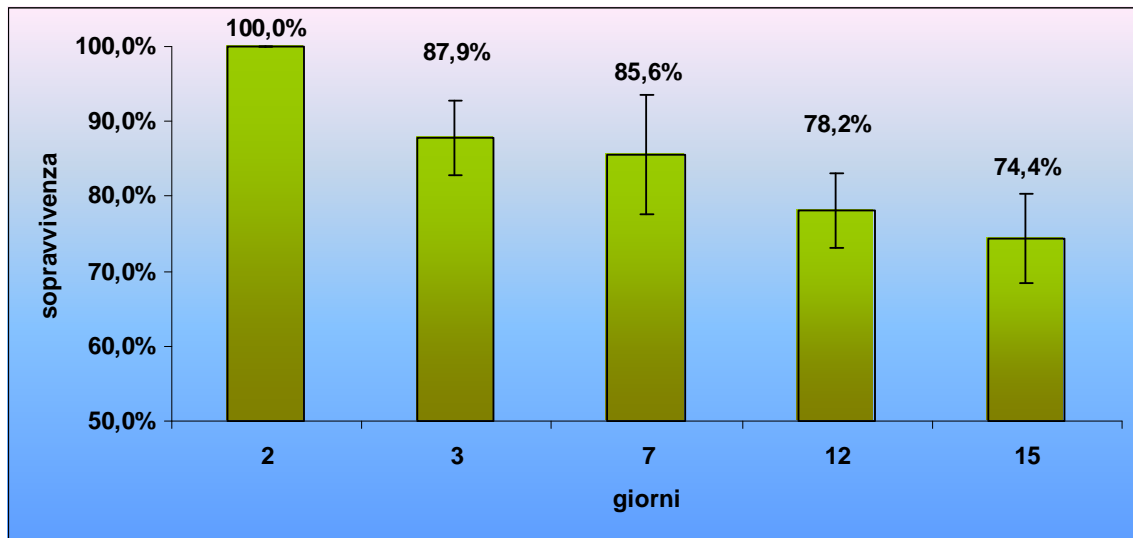


Fig. 5.24. Sopravvivenza (%) di larve di *Psetta maxima* durante la fase a mesocosmo

Alla fine dei primi 15 giorni di vita (mesocosmo appunto) la sopravvivenza delle larve di rombo si è attestata al 74 % (fig. 5.24).

L'impianto pilota sperimentale a circuito chiuso e il trattamento a pacchetti delle acque reflue si dimostrarono affidabili dal momento che le concentrazioni di ammoniaca, nitriti e nitrati si mantennero sempre costantemente basse per tutta la durata della sperimentazione. La concentrazione dei parametri chimici monitorati non ha mai superato i limiti di tossicità, anche durante la fase di alimentazione, a dimostrazione della particolare efficienza del sistema di trattamento a pacchetto adoperato per rigenerare l'acqua da reintegrare nel sistema a circuito chiuso. Anche le larve di rombo si sono ben adattate all'impianto sperimentale a circuito chiuso. Le larve sopravvissute si sono ben sviluppate dal momento che non presentavano evidenti segni di malformazioni e/o deformità apparenti (fig. 5.25).

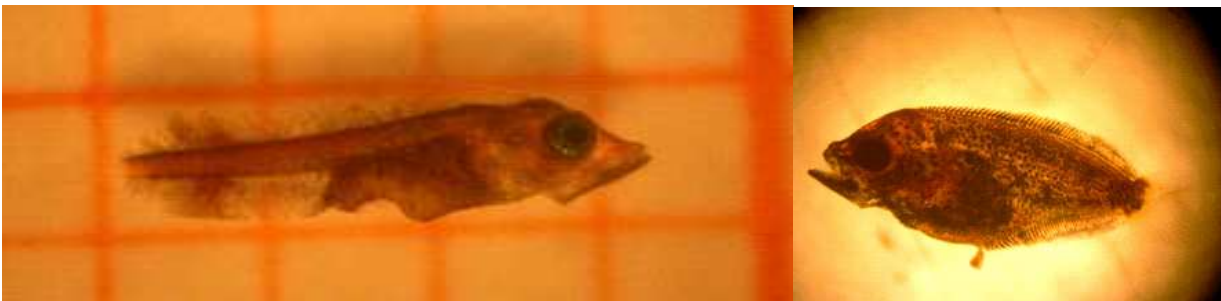


Figura 5.25. Immagini di larve di *Psetta maxima* scattate dopo 10 (sinistra) e 20 (destra) giorni.

Nelle colture intensive il rinnovo dell'acqua è continuo fin dall'inizio dell'allevamento larvale. In tali colture si utilizza una densità larvale pari a 10 larve/l, mentre il mesocosmo ha consentito l'utilizzo di una densità larvale pari a 5 larve/l e garantendo una sopravvivenza più alta. La

percentuale di sopravvivenza è simile ai valori riportati in letteratura per larve allevate in impianti a circuito chiuso: 80 %.

L'applicazione del sistema di *trattamento a pacchetti* e la determinazione delle sue dimensioni durante la prima fase permise di effettuare le integrazioni idriche giornaliere per la pulizia quotidiana del mesocosmo rispettando il quantitativo previsto di 100 l.

La scelta del trattamento dipende da obiettivi determinati sulla base di considerazioni economiche e ambientali. In sistemi intensivi *flow-through*, il trattamento dell'acqua è normalmente limitato all'aerazione / ossigenazione e rimozione dei solidi. Nelle *hatchery e nursery* con sistema *flow-through*, vi sono ampie variazioni nella qualità dell'acqua, che diventa così difficile da controllare. Per contro, i *sistemi a ricircolo*, includendo biofiltrazione e sterilizzazione in aggiunta ai processi menzionati sopra (Piedrahita, 2003), forniscono un *medium* di allevamento costante e controllabile. Gli scambi di calore, con conseguenti sprechi energetici, nei sistemi a ricircolo possono essere ridotti al minimo: il risparmio energetico nel riscaldamento necessario per la produzione di 1 g di avannotti corrisponde a circa il 50% del costo di produzione di avannotti nelle *nursery flow-through* (Blancheton, 2000).

Il sistema di *trattamento a pacchetti* per il recupero delle acque reflue (apparentemente esauste) offrì l'opportunità di ottimizzare il sistema a circuito chiuso (per quanto concerne consumi idrici e produzione di reflui) sia per le produzioni fitoplanctoniche che per quelle zooplanctoniche, larvali e di bivalvi, tutte strettamente dipendenti dalle prime.

## Capitolo 6

### Conclusioni

L'ottimizzazione delle colture fitoplanctoniche allevate in grandi volumi ci porta a concludere che:

- L'organizzazione per la gestione dei differenti moduli del sistema a circuito chiuso degli impianti pilota del CRIAcq, basata sul calcolo e l'uso di quantità definite (pacchetti) di acqua ricircuitante, ha consentito di programmare gli interventi e le produzioni con evidente precisione per l'intero arco della ricerca. Ciò è strategicamente importante per il trasferimento tecnologico al settore privato dell'acquacoltura.

- Il trattamento meccanico-biologico è stato beneficiato dalla presenza nei reflui di alghe che hanno permesso l'abbattimento dei nitrati senza espedienti tecnici quali denitratori anaerobici o diluizione con altra acqua proveniente dall'esterno.

- Nonostante una tendenza generale delle colture algali a crescere maggiormente nel medium proveniente dal pacchetto sterilizzato col metodo fisico o congiunto, le differenze con il metodo fisico non sono sempre supportate da significatività statistica sia sui piccoli e medi volumi che sui grandi. In considerazione dell'ecosostenibilità e dell'ecocompatibilità, si preferì svincolarsi dall'uso, anzi dall'abuso di prodotti chimici. L'attività sperimentale pilota si orientò sull'uso esclusivo dell'U.V. per i grandi volumi, sebbene il metodo congiunto sia una valida alternativa.

- La larvicoltura di *Psetta maxima* a circuito chiuso è stata possibile grazie all'utilizzo di fitozooplankton allevato con acque ricircuitanti trattate a pacchetti.

La valorizzazione delle specie acquatiche autoctone mediante una gestione responsabile delle risorse idrobiologiche e l'adozione di modelli produttivi per una acquacoltura ecocompatibile ed ecosostenibile è possibile attraverso l'introduzione del metodo di trattamento *a pacchetti* per il riutilizzo dei reflui del sistema a circuito chiuso anche nelle fasi più delicate e strategiche dell'allevamento, ovvero schiusa, fito-, zoo- e larviculture fino ad almeno il preingrasso, anche lontano dalle coste e indipendentemente dalla possibilità di approvvigionamento idrico, con il successivo trasferimento per l'ingrasso in sistemi di allevamento off-shore sommergibili. Tutto ciò ridurrebbe drasticamente il conflitto per lo sfruttamento della risorsa acquatica con le altre attività produttive e/o ricreative in ambito marino-costiero.

Le prime prove di schiusa ed allevamento larvale di *Psetta maxima* condotte nella regione Campania hanno permesso di mettere a punto le basi per un modello di sviluppo per l'allevamento a circuito chiuso e a ciclo integrato (principi dell'ecosostenibilità e dell'ecocompatibilità) di *Psetta maxima* (valorizzazione delle risorse autoctone).

## Bibliografia

- Ackefors**, H. and Enell, M. (1990). *Discharge of nutrients from Swedish fish farming to adjacent sea areas*. *Ambio* 19, pp. 28-35.
- Alcantara**, L.B., Calumpang, H.P., Martinez-Goss, M.R., Menez, E.G. and Israel, A. (1999). *Comparison of the performance of the agarophyte, *Gracilariopsis bailinae*, and the milkfish, *Chanos chanos*, in mono- and biculture*. *Hydrobiologia* 398/399, 443–453.
- Bean**, E.L. (1959). *Ozone production and costs*. In: *Ozone chemistry and technology*. *Advan. in Chem. Ser.*, 21:465.
- Bedell**, G.W. (1971). *Eradicating *Ceratomyxa shasta* from infected water by chlorination and ultraviolet irradiation*. *Prog. Fish-Cult.* 33: 51-54.
- Blancheton**, J.P. (2000). *Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species*. *Aquacultural Engineering* 22, 17–31
- Boyazoglu**, J. (1992). *Sustainable Agriculture, Animal Production Development and the Environment*. Symp. on Livestock and the Environment, Korean Society, Seoul, December.
- Brown**, M.R. (2003). *Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture*. CSIRO Marine Research, GPO Box 1538, Hobart, 7001 Australia.
- Bullock**, G.L. and Stuckey, H.M. (1977). *Ultraviolet treatment of water for destruction of five Gram-negative bacteria pathogenic to fishes*. *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 1244-1249.
- Burrows**, R.E. and Combs, B.D. (1968). *Controlled environments for salmon propagation*. *Prog. Fish-Cult.* 30: 123-136.
- Buschmann**, A.H., Troell, M., Kautsky, N. and Kautsky, L. (1996). *Integrated tank cultivation of salmonids and *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta)*. *Hydrobiologia* 326/327, 75–82.
- Carvalho** A.P. and Malcata F.X. (2005). *Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes*. *Marine Biotechnology* 7: 381-388.
- Cataudella**, S. e Bronzi, P. (2001). *Acquacoltura responsabile*. Unimar-Uniprom, Roma, 685 pp.
- Chamberlaine**, G. and Rosenthal, H. (1995). *Aquaculture in the next century: opportunities for growth, challenges for stability*. *World Aquac. Soc. Mag.* 26 (1), 21–25.
- Conrad**, J.F., Holt, R.A. and Kreps, T.D. (1975). *Ozone disinfection of flowing water*. *Prog. Fish-Cult.* 37: 134-136.
- Del Campo** J.A., Rodriguez H., Moreno J., Vargas M.A., Rivas J. and Guerriero M.G.

(2004). *Accumulation of astaxanthin and lutein in Clorella zofigiensis (Chlorophyta)*. Applied Microbiol. Biotechnol. 64, 848-854.

**De la Noue, J.** and Prouix, D., (1986). *Biological tertiary treatment of urban wastewater with chitosan immobilized Phormidium*. Appl. Microbiol. Biotech., 29: 292-297.

**Delaporte, M.,** Soudant, P., Moal, J., Lambert, C., Quéré, C., Miner, P., Choquet, G., Paillard, C. and Samain, J.F. (2003). *Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species – Crassostrea gigas and Ruditapes philippinarum*. The Journal of Experimental Biology 206: 3053-3064.

**De Pauw, N.,** Morales, J. and Persoone, G. (1978). *Tertiary treatment of swine manure by culturing of algae*. Mitt. Inter Nat. Verein. Limnol., 21: 405-506.

**Dhert, P.** (1996). *Rotifers*, 61-100. In Lavens, P., Sorgeloos, P., (Ed.) Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, Roma.

**Dickerman, J.M. ,** Castraberti, A.O. and Fuller, J.E. (1954). *Action of ozone on water born bacteria*. J. New Engl. Water Works Assoc., 68:11-14.

**FAO** (1995). *Code of Conduct for Responsible Fisheries*. FAO: 41 pp.

**FAO** (1997). *Aquaculture development. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries*. No. 5. Rome, FAO: 40 pp.

**Fetner, R.H.** and Ingols, R.S. (1959). *Bactericidal activity of ozone and chlorine against Escherichia coli at 1 degree C*. In: Ozone chemistry and technology. Advan. in Chem. Ser., 21:465.

**Giaoutzi, M.** and Nijkamp, P. (1993). *Decision Support Models for Sustainable Development*. Aldershot, Avebury.

**Gowen, R.J.** and Bradbury, N.B. (1987). *The ecological impact of salmonid farming in coastal waters: A review*. Oceanography and Marine Biology Annual Review, vol.25, pp. 563-575.

**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.

**Hirata, H.** and Nagata, W.D. (1982). *Excretion rates and excreted compounds of the rotifer Brachionus plicatilis O.F. Müller in culture*. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., 31: 161-174.

**Hoffman, G. L.** and Putz, R.E. (1969). *Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat, and chemicals on the spores of Myxosoma cerebralis*. Prog. Fish-Cult. 31: 35-37.

**Impiccini, R.,** Rossi, R. e Melotti, P. (1996). *Acidi grassi e contenuto lipidico di ceppi algali*. Istituto di Zoocolture, di Bologna, Università di biologia di Ferrara.

**Jones, A.B.,** Dennison, W.C. and Preston, N.P. (2001). *Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study*. Aquaculture 193, 155–178.



**Krom, M.D.** 1986. *An evaluation of the concept of assimilative capacity as applied to marine waters*. *Ambio* 15, 208–214.

**Liltved, H.** and Cripps, S.J. (1999). *Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation*. *Aquaculture Research*, Vol. 30, n. 6, pp. 445-450.

**Matassino, D.** (1992). *Il ruolo del germoplasma animale autoctono nell'ecosistema culturale*. Atti Conv. Progetto ambiente 1992, Colle Sannita (BN), 14-15 febbraio. *L'Allevatore*, 48, (17), 18.

**Matassino, D.** (1996). *Produzione animale: una "congettura" nel sistema agro-alimentare-ambientale?* Atti Conv. "Le Agro-biotecnologie: didattica, ricerca e applicazione", Bologna, 29 febbraio - 1 marzo. Università degli Studi di Bologna, 127.

**Matassino, D.** (1997). *Biotechnologies in the agro-eco-system*. Proc. Int. Cong. 'New trends in Biotechnology '97 - Science and Education -Industrial Biotechnologies, Basic Sciences and Biotechnologies', Capri, 26-28 maggio.

**Matassino, D.** and Cappuccio, A. (1998). *Costs of animal products and standard of living*. Proc. of 8th World Conference on Animal Production, Seoul, June 28-July 4. Special Symposium & Plenary Sessions, 559. Costi dei prodotti animali e standard di vita. *L'Allevatore*, 54 (14), 1.

**Matassino, D.** (2001). *I parchi tra cultura , ecologia e turismo*. Atti Conv: 'I parchi tra cultura , ecologia e turismo', S. Margherita Ligure (GE), 26 settembre 2000. *L'Allevatore*, 57 (2): 9-12, 2001. *Linea Ecologica*, 33: 2.

**Mitsch, W.J.** and Jørgensen, S.E. (1989). *Ecological Engineering*. An introduction to Ecotechnology. John Wiley & Sons, New York. 472 pp.

**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.

**Neori, A.,** Krom, M.D., Ellner, S.P., Boyd, C.E., Popper, D., Rabinovitch, R., Davidson, P.J., Dvir, D., 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, 183–199.

**Neori, A.,** Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A.H., Kraemer, G.P., Halling, C., Shpigel, M. and Yarish, C. (2004). *Integrated aquaculture: rationales, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture*. *Aquaculture* 231, 361–391.

**Pearce, D.W.,** Markawandya, A. e Barbieri, E. (1989). *Blueprint for a Green Economy*. Earthscan, London.

**Piedrahita, R.H.** (2003). *Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation*. *Aquaculture* 226, 35–44.

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

**Prestamburgo, S.** (1998). *Conflitti nell'uso del suolo: la tutela del paesaggio agrario ed il riordino fondiario*. Atti Conv. "Agricoltura, Paesaggio e Sistema Urbano" - Univ. degli Studi di Udine, 19-20 febbraio.

**Przytocka-Jusiak, M., Duszota, M., Matusiak, K. and Mycielski, R.** (1984). Intensive culture of *Chlorella vulgaris*/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. *Water Research* 18, 1-7.

**Rao, K.K. and Hall, D.O.** (1987). Immobilized photosynthetic system. Applications in Biotechnology. Biosphere Science Div. King's College London, London, UK.

**Ratledge, C.** (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 1047-1050.

**Sanchez, E.P., Weiland, P., and Travieso, L.** (1991). A combined system for cattle manure treatment with biogas production and nutrient removal. Institute of Technology, FAL, Braunschweig, Germany.

**Sanders, J.E., Fryer, J.L., Leith, D.A. and Moore K.D.** (1972). Control of the infectious protozoan *Ceratomyxa Shasta* by treating hatchery water supplies. *Prog. Fish-Cult.* 34: 13-17.

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

**Spotte, S.** (1979). *Fish and Invertebrate culture: Water management in closed systems*. 2nd ed. John Wiley and Sons, Toronto. 179 p.

**Suantika, G., Dhert, P., Sweetman, E., O'Brien, E. and Sorgeloos, P.** (2003). *Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system*. *Aquaculture* 227, 173-189.

**Tancioni, L. e Scardi, M.** (2001). *Ecologia in acquacoltura*. In: *Acquacoltura Responsabile*. A cura di Cautadella S., e Bronzi P. Ed. Unimar-Uniprom. pp. 352-374.

**Trotta, P.** (2001). *Vegetali acquatici*. In: *Acquacoltura Responsabile*. A cura di Cautadella S., e Bronzi P. Ed. Unimar-Uniprom. pp. 154-175.

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

**Vilchez, C., Garbayo, I., Lobato, M.V. and Vega, J.M.** (1997). *Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal (Review)*. *Enzyme and Microbial Technology* 20:562-572

**Vlasenko, M.I.** (1969). *Ultraviolet rays as a method for the control of diseases of fish eggs and young fishes*. *Probl. Ichthyol.* 9: 697-705.

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

**Zmora, O. and Shpigel, M.** (2006). *Intensive mass production of Artemia in a recirculated system*. Aquaculture 255, 488–494

**Zucker, D.A. and Anderson, J.L.** (1999). *A dynamic, stochastic model of a land-based Summer Flounder *Paralichtys dentatus* aquaculture firm*. J. World Aquac. Soc. 30, 219– 235.

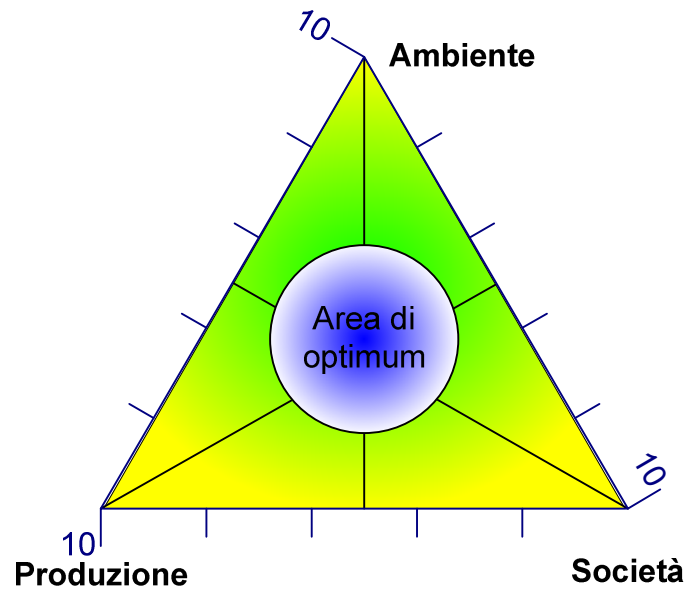


Figura 1.1. Diagramma a triangolo equilatero per la realizzazione della logica di sviluppo sostenibile attraverso l'ottimizzazione dinamico-sistemica

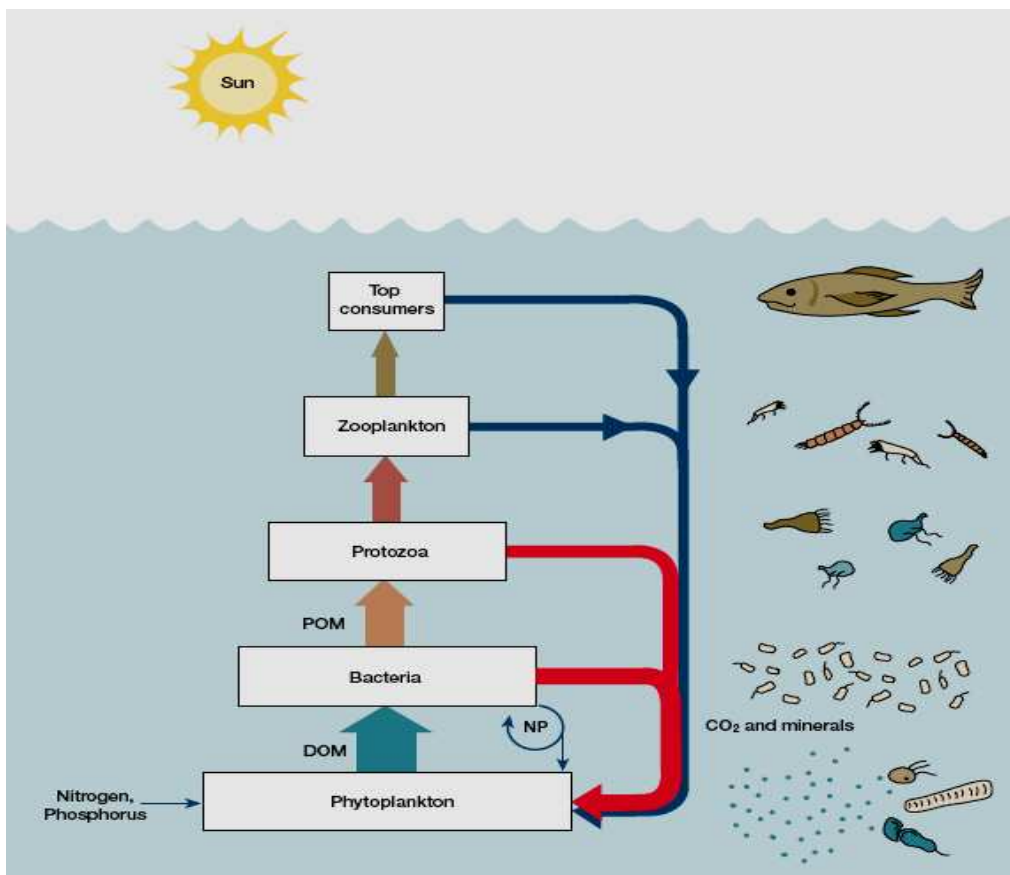


Figura 1.2. Rete trofica acquatica: l'acquacoltura tenta di imitarla in ambiente confinato a fini produttivi sia in modo estensivo che intensivo

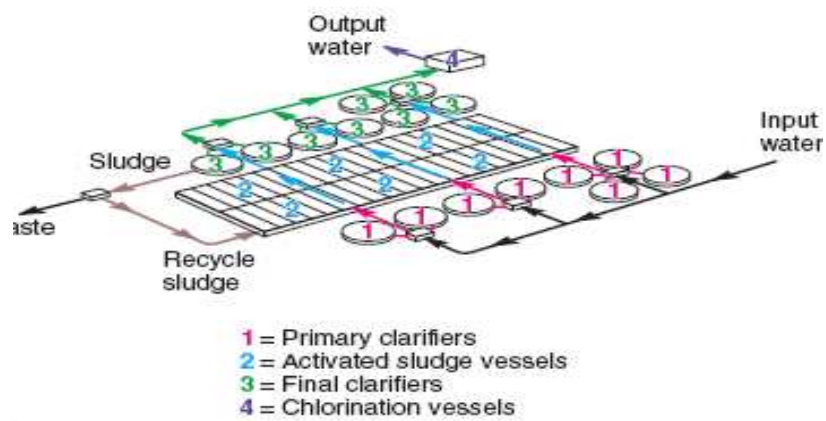


Figura 1.3. Schema di un tipico impianto industriale di trattamento dei reflui

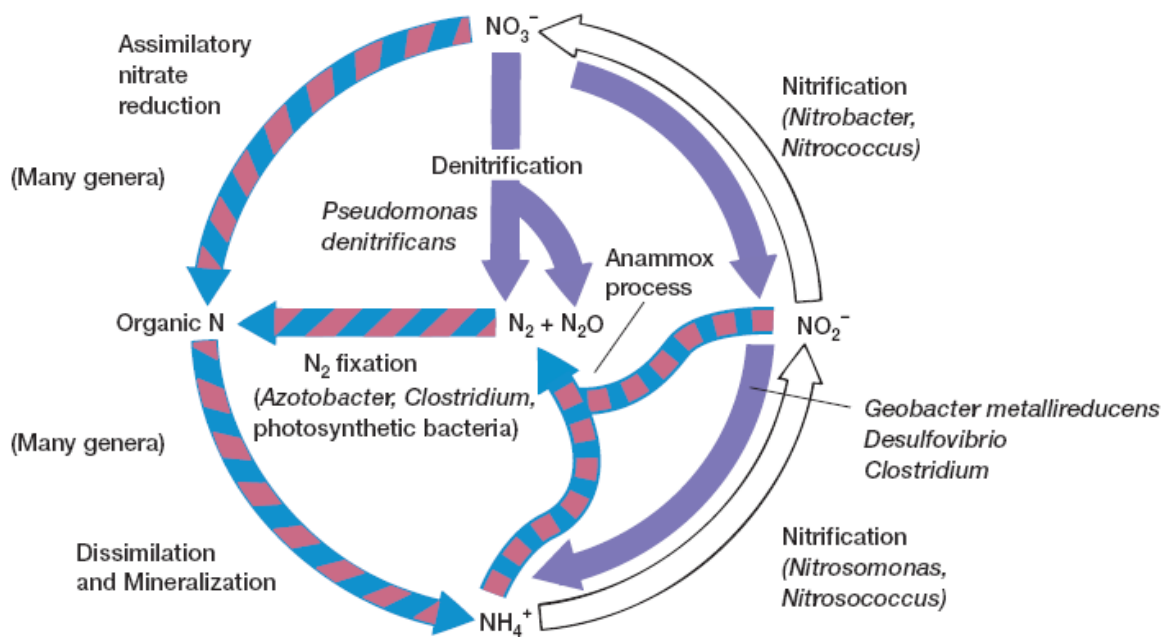


Figura 1.4. Ciclo dell'azoto. La nitrificazione avviene in condizioni aerobiche, mentre la denitrificazione avviene in condizioni anaerobiche

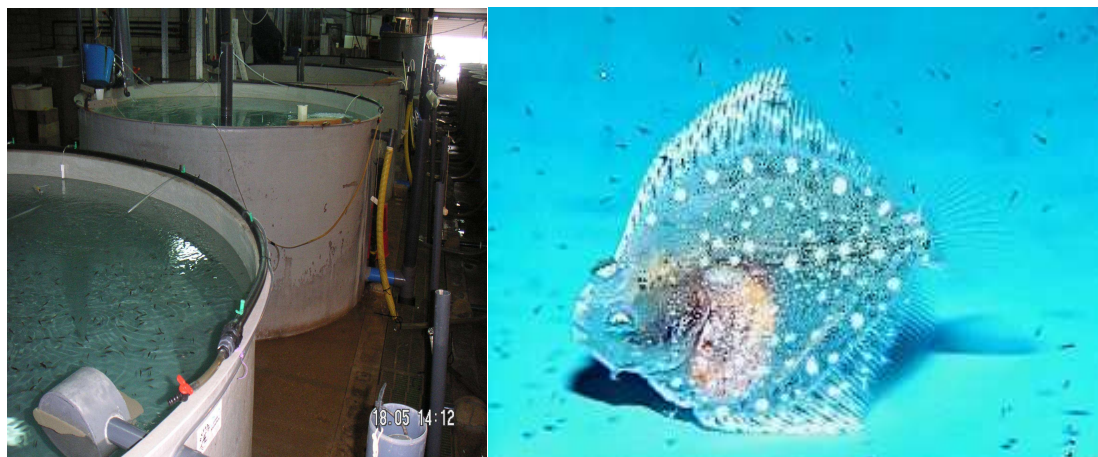


Figura 1.5. Allevamento larvale di *Psetta maxima* (a destra) all'interno di vasche di poliestere con scarico centrale ed in presenza di fito- e zooplancton (tecnica del mesocosmo) (a sinistra)

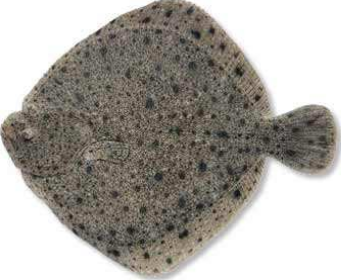
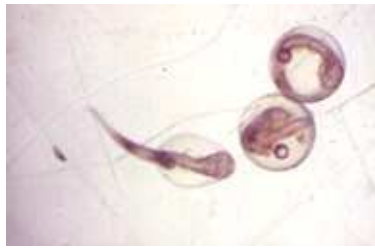
<b>Ordine: Pleuronettiformi</b>	
<b>Famiglia: Scoftalmidi</b>	
<b>Classe: Actinopterigi</b>	
<b>Colorazione: lato sinistro bruno-verde o giallo-bruno spesso macchiato; lato destro liscio e privo di pigmentazione</b>	
<b>Pinne: presenta due pinnette, una dorsale, l'altra ventrale</b>	
<b>Squame: È privo di squame ma dotato di tubercoli ossei</b>	
<b>Denti: piccoli e affilati, disposti in varie serie</b>	
<b>Lunghezza: può raggiungere oltre 1 m</b>	
<b>Peso: fino ai 12 Kg</b>	
<b>Diffusione: comune nel Mediterraneo, nel Mar Nero e nell'Oceano Atlantico</b>	
<b>Demersale, vive su fondali sabbiosi e ghiaiosi, ad una profondità tra i 25 e gli 80 m</b>	
<b>Specie euriterma ed eurialina, in grado di tollerare temperature comprese tra i 5 e i 25°C e di sopravvivere in acque con salinità variabile tra i 10 e i 40 mg/l</b>	
<b>Ha comportamento bentonico, ma nell'intorno di 100 km</b>	

Figura 1.6. Scheda descrittiva delle principali caratteristiche del rombo chiodato (*Psetta maxima*)



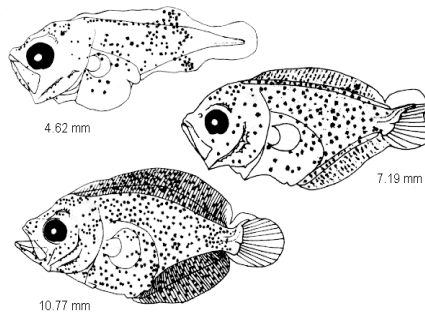
Uova in fase di schiusa



Larva al 2-3° giorno di vita



Larva al 5-6° giorno di vita



Larva al 8-15-20° giorno di vita



Larva di *Psetta maxima* al 40-45 ° giorno

Figura 1.7. Stadi di crescita larvale di *Psetta maxima*

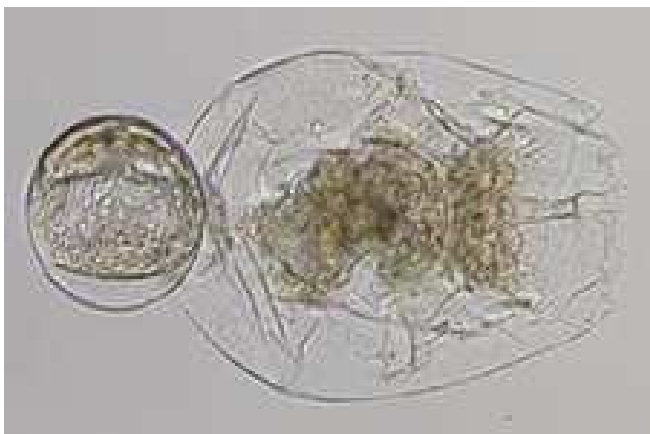


Figura 1.8. Rotiferi (*Brachionus plicatilis*) ed *Artemia salina*



Figura 2.1. Esempio di sfruttamento della biofiltrazione assimilativa vegetale per scopi produttivi con riduzione del carico inquinante del refluo.

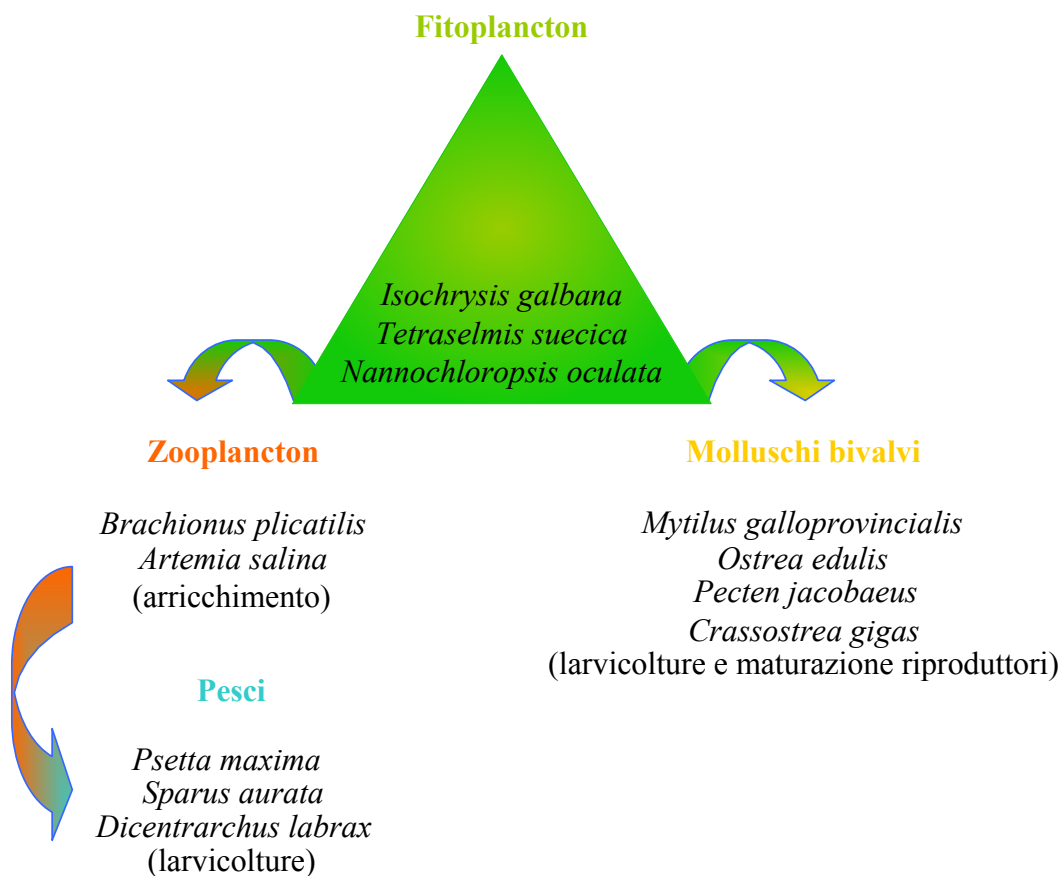


Figura 2.2. Catena trofica nei processi di produzione di specie acquatiche marine come pesci e bivalvi di elevato interesse commerciale





Figura 2.3. Fotobioreattori ad illuminazione artificiale (indoor) e naturale (outdoor) e coltivazioni massive in bacini all'aperto.

Genere	Specie	Colore	Concentrazione (cell/ml)	Taglia (µm)
<i>Chaetoceros</i>	<i>calcitrans</i>	marrone	$5 \times 10^6$	4-5
<i>Chaetoceros</i>	<i>gracilis</i>	marrone	$5 \times 10^6$	7-30
<i>Thalassiosira</i>	<i>pseudonana</i>	marrone	$5 \times 10^6$	12-40
<i>Skeletonemas</i>	<i>costatum</i>	marrone	$3 \times 10^6$	5-8
<i>Phaeodactylum</i>	<i>tricornutum</i>	marrone	$5 \times 10^6$	8
<i>Isochrysis</i>	<i>galbana</i>	bruno	$17-70 \times 10^6$	3-4
<i>Pavlova</i>	<i>lutheria</i>	bruno	$15 \times 10^6$	2-3
<i>Tetraselmis</i>	<i>suecica</i>	verde	$2-5 \times 10^6$	8-10
<i>Dunaliella</i>	<i>fertiolecte</i>	verde	$2 \times 10^6$	8-10
<i>Nannochloropsis</i>	<i>oculata</i>	bruno-verde	$90-120 \times 10^6$	2-3

Tabella 2.1. Concentrazioni cellulari raggiungibili da alcune tra le più diffuse specie algali coltivate in allevamento intensivo

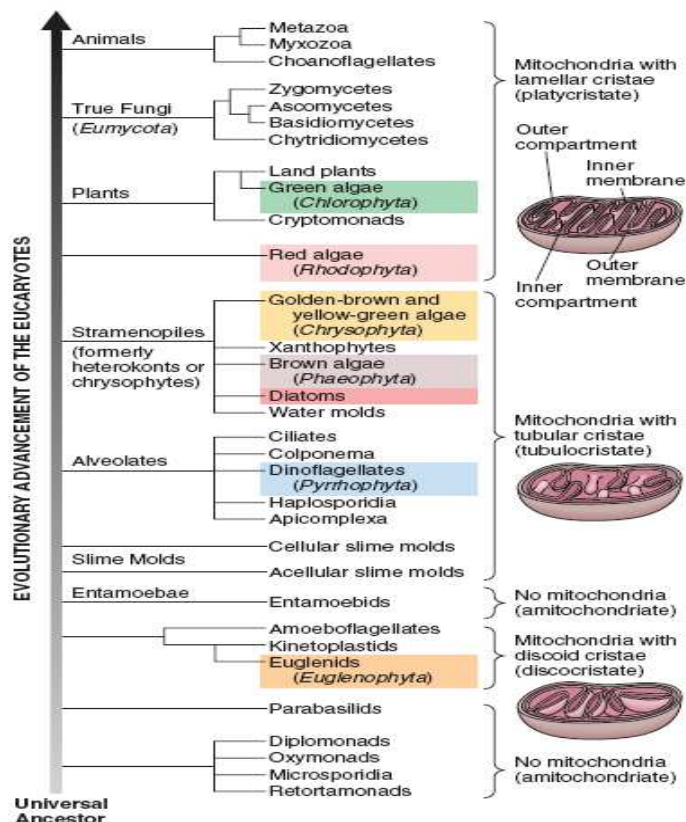


Figura 2.4 Gruppi tassonomici di appartenenza delle principali microalghe utilizzate in acquacoltura: diatomee, flagellate, ecc.

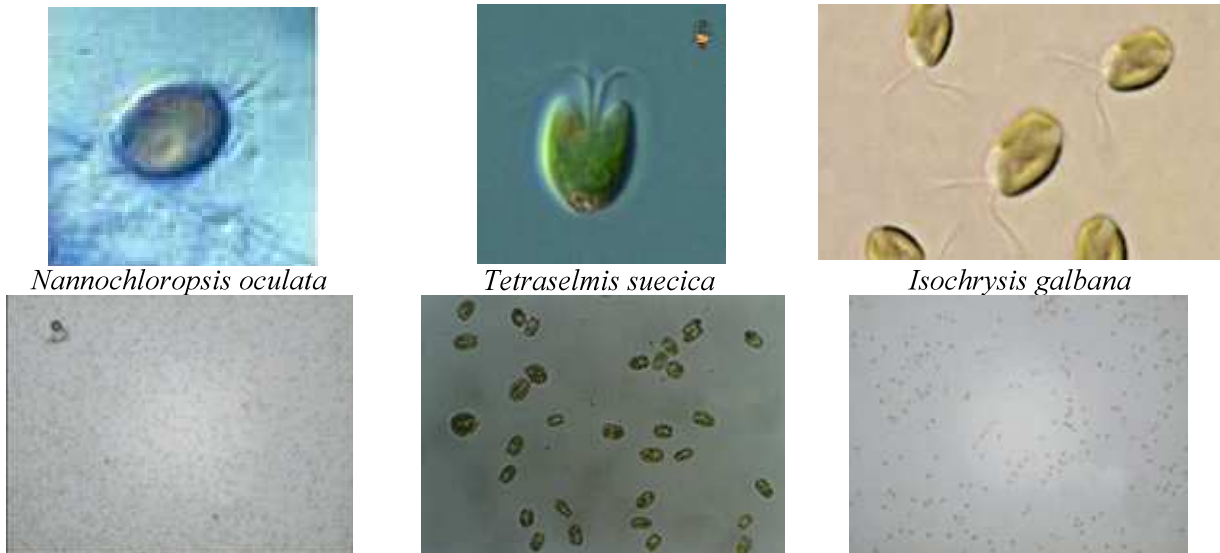


Figura 2.5. Specie algali allevate: aspetto cellulare e colturale delle tre microalghe osservate al microscopio.

	<i>N. oculata</i>	<i>T. suecica</i>	<i>I. galbana</i>
Misura dell'alga	2-6 $\mu\text{m}$	8-16 $\mu\text{m}$	5-6 $\mu\text{m}$
Tipo di alga	Verde	Verde flagellata	Marrone flagellata
Uso	Zooplankton, Coralli, Greenwater per crostacei.	Larve di Gamberi, Rotiferi, Artemia, Molluschi.	Zooplankton, molluschi.
Calorie	48.4	48.2	45.5
Vitamina C	0.85%	0.25%	0.4%
Clorofilla A	0.89%	1.42%	0.98%
Proteine	52.11%	54.66%	46.69%
Carboidrati	12.32%	18.31%	24.15%
Grassi	27.64%	14.27%	17.07%
EPA	25%	9.3%	2.5%
ARA	5.26%	0.40%	0.52%
DHA	-	-	10.2%

Tabella 2.2. Caratteristiche (dimensioni, destinazioni e nutrienti) delle specie algali allevate

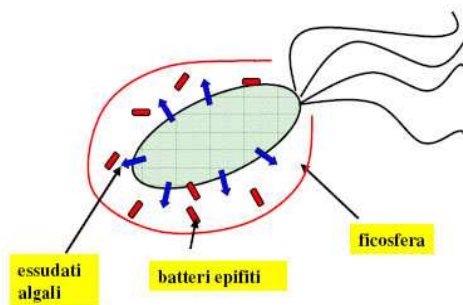


Figura 4.1. La fiosfera. Le microalghe rilasciano sostanze (essudati) che favoriscono lo sviluppo dei batteri epifiti che a loro volta producono sostanze stimolanti la crescita algale.

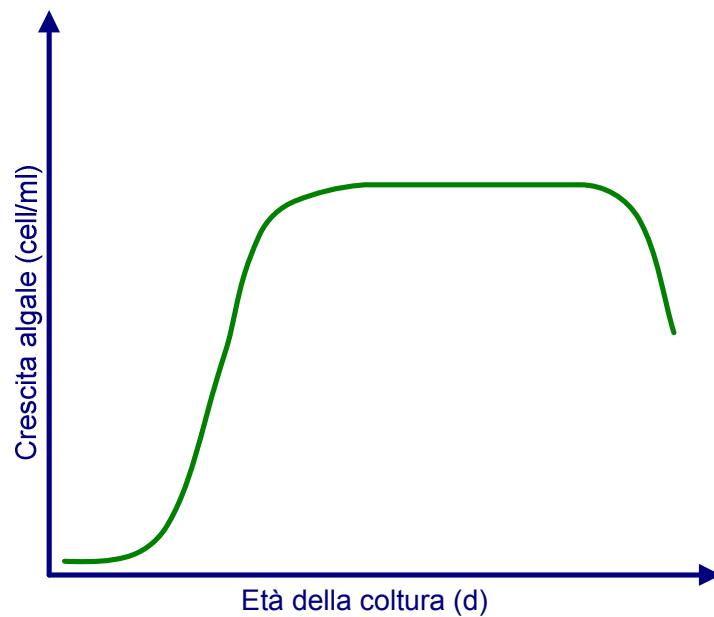


Figura 4.2. La curva di crescita algale.

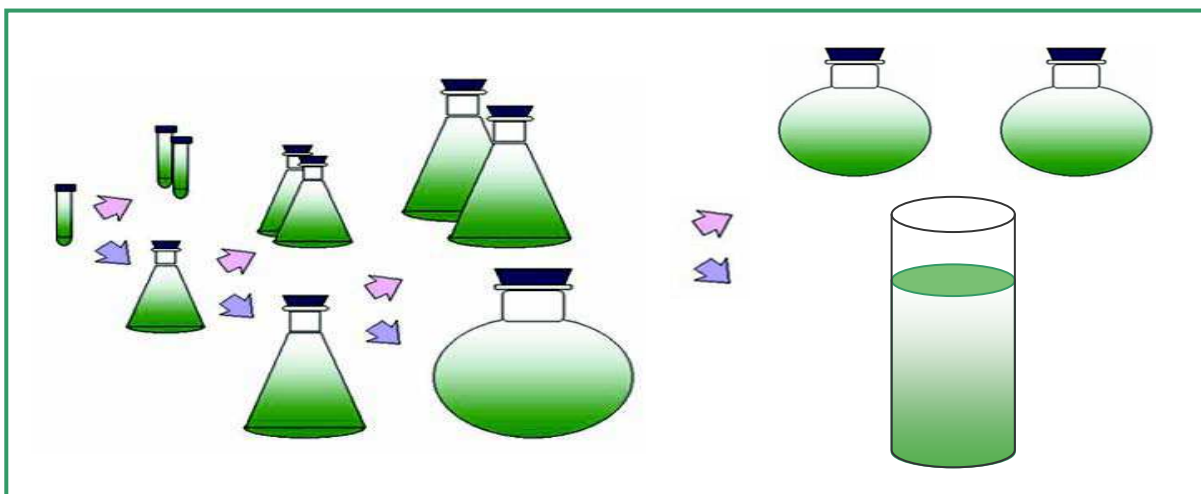


Figura 4.3. Steps successivi in un ciclo produttivo di biomassa fitoplanctonica: passaggio progressivo delle colture dalla provetta ai fotobioreattori



Figura 4.4. Preparazione del terreno di coltura Guillard F/2 con sterilizzazione in autoclave

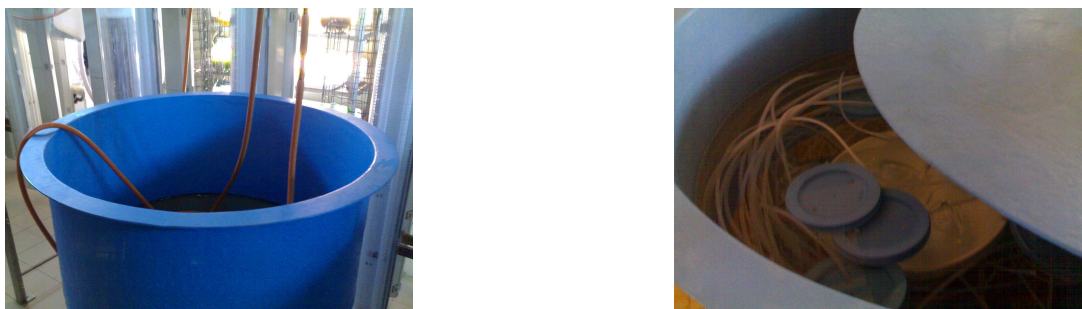


Figura 4.5. Attrezzatura (beute, palloni, tubi in gomma per aerazione, tappi in plastica e vari cilindri graduati) sterilizzata chimicamente ( immersione in acqua e ipoclorito per 24 ore). Successivamente i materiali sono stati sciacquati prima con acqua dolce e poi con acqua distillata.

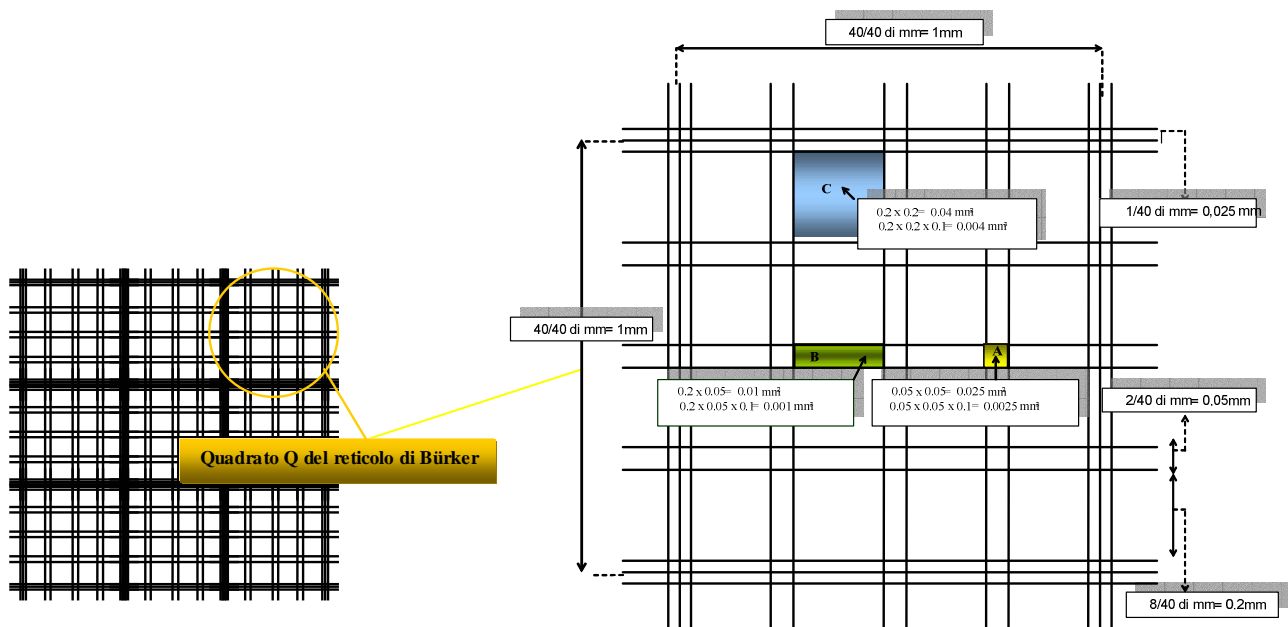
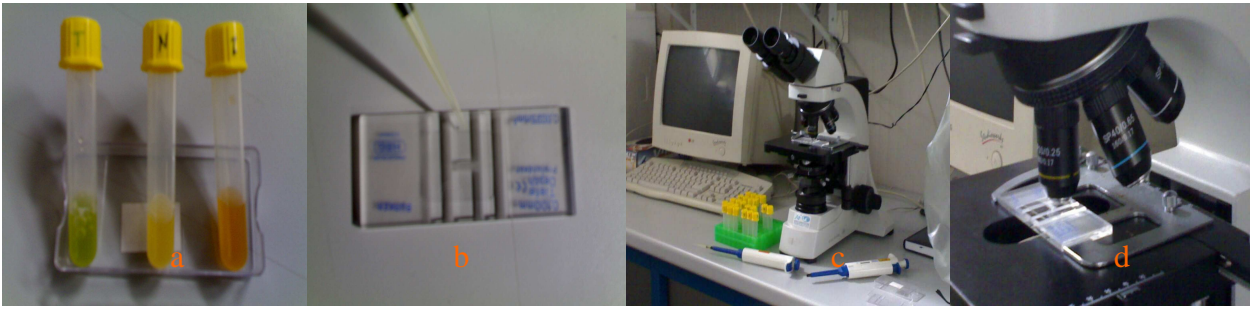


Figura 4.6. Camera di conta Bürker.



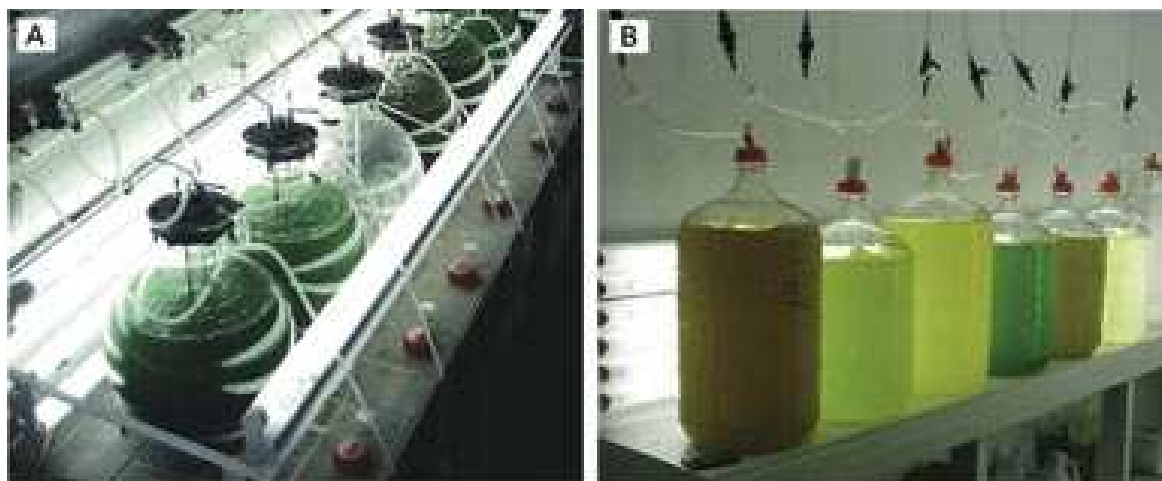
*Figura 4.7. Operazioni di conta: campionamento (a); caricamento del campione nella camera di Bürker (b); posizionamento della camera di conta al microscopio ottico (c); conta cellulare (d)*



*Figura 4.8. Colture starter o madri*



*Figura 4.9. Colture starter o madri e colture intermedie.*



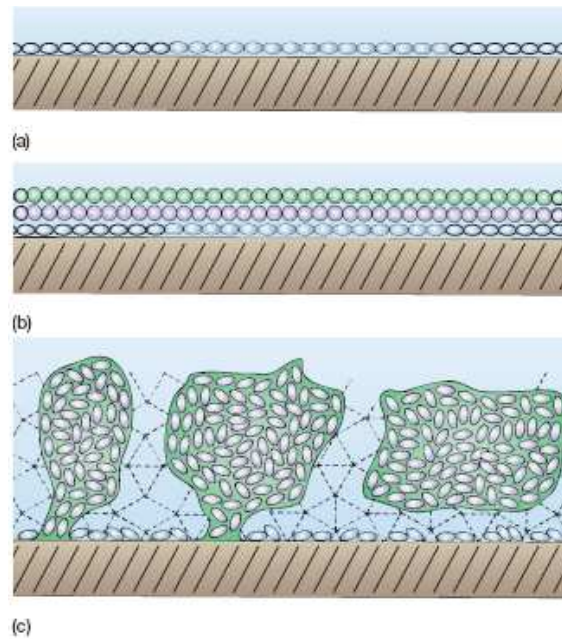
*Figura 4.10. Colture intermedie: boccioni e bottiglie da 5 l.*



*Figura 4.11. Modulo a circuito chiuso adoperato per l'allestimento del Mesocosmo. Al centro il filtro meccanico a sabbia e a destra il materiale filtrante all'interno del filtro biologico a percolatore.*



*Figura 4.12. Monitoraggio parametri chimico-fisici: sonda multiparametrica (termometro e pHmetro); rifrattometro; ossimetro; spettrofotometro*



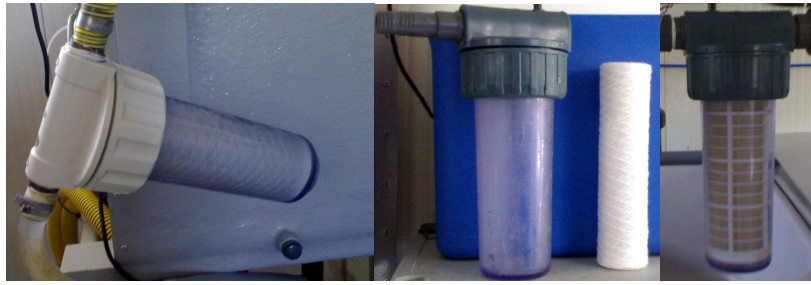
*Figura 4.13. La crescita del biofilm dipende dalle fonti energetiche disponibili ed è complessa. (a) colonizzazione iniziale da parte di un singolo tipo di batterio; (b) sviluppo di più tipi di microrganismi stratificati; (c) biofilm maturo con aggregati cellulari, pori interstiziali e condotti*



*Figura 4.14. Stazione sperimentale di Salerno-CRIAcq*



*Figura 4.15. Locale di servizio: serbatoi di stoccaggio acqua di mare, soffianti, gruppi elettrogeni*



*Figura 4.16. Filtri meccanici a cartuccia Cart-gemma. Maglie da 10, 30 e 60  $\mu\text{m}$ .*



*Figura 4.17. Sistema di filtrazione meccanico-biologico (a); vasca per stoccaggio reflui per la formazione del pacchetto; prima sedimentazione (b); modulo avannotteria utilizzato per le prove di sterilizzazione (c).*



*Figura 4.18. Reparto molluschi bivalvi: adattamento e maturazione riproduttori (a); schiuditoio (b); modulo per il trattamento meccanico (filtro a cartuccia) (c), biologico (percolatore) (d) e sterilizzante (U.V.) (e) dei riproduttori*





*Figura 4.19. Il modulo per la riproduzione ed emissione di uova di Penaeus: vasche cilindriche in PVC per riproduttori a fondo sabbioso (a); vasche rettangolari in vetroresina per le post-larve (b); vasche troncoconiche in vetroresina per l'emissione delle uova (c)*



*Figura 4.20. Il modulo per la produzione di fitozooplancton: scaffalatura per beute e bocce di vetro (5-10 l) illuminata da lampade al neon fitostimolanti (a e b); supporti per sacchi in polietilene costituiti da: base di appoggio in vetroresina o plastificata e supporto di rinforzo verticale a maglie in ferro plastificato e lampade al neon fitostimolanti montate verticalmente a fianco al supporto (c)*



*Figura 4.21. Colture in grandi volumi. Sacchi in polietilene per fitoplancton da 190 l (a destra) e cilindri in plexiglass per fitoplancton da 250 l con retroilluminazione da 2.500-4.000 lux*