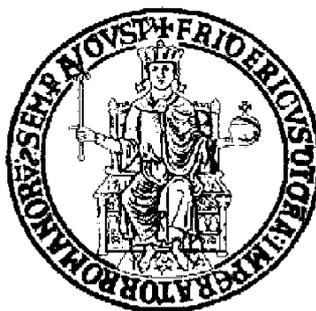


**Università degli Studi di Napoli *Federico II***



**Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie e Agro-Alimentari**

**Dottorato di Ricerca**

**in**

**Scienze e Tecnologie delle Produzioni Agro-Alimentari**

**Indirizzo Acquacoltura**

**XXIII Ciclo**

***Allevamento di organismi acquatici in sistema a circuito chiuso per applicazioni acquacolturali ed ecologiche***

**Coordinatore**

***Ch.mo Prof. Giancarlo BARBIERI***

**Relatore**

***Ch.mo Prof. Giovanni SANSONE***

**Dottorando**

***Dr. Francesco Del Prete***

# Indice

<b>Premessa</b>	6
<b>Capitolo 1 Introduzione</b>	9
1.1 Produzioni acquacolturali e loro impatto ambientale	10
1.1.1 Acquacoltura ecosostenibile ed ecocompatibile	11
1.1.2 Acquacoltura intensiva da una prospettiva ecologica	17
1.1.3 Impatto ambientale dell'acquacoltura intensiva	19
1.2 Sistemi produttivi a ricircuitazione idrica (RAS)	21
1.3 Stato dell'arte sulle produzioni in RAS	22
1.4 Utilizzo di organismi acquatici, gameti ed embrioni in applicazioni ecologiche e criobiologiche	24
1.4.1 Monitoraggio ambientale	24
1.4.2 Criobiologia	28
<b>Capitolo 2 Scopo della Ricerca e Piano Sperimentale</b>	31
2.1 Scopo della Ricerca	32
2.2 Piano Sperimentale	32
<b>Capitolo 3 Materiale e Metodi</b>	35
3.1 Descrizione Stazione Sperimentale di Salerno del CRIAcq	36
3.2 Ottimizzazione della gestione delle acque nel sistema a ricircuitazione idrica	37
3.2.1 Sistema di trattamento delle acque	37
3.2.2 Parametri chimico-fisici	38
3.2.3 Analisi microbiologiche delle acque	39
3.2.4 Indagini ecotossicologiche	40
3.2.5 Gestione e trattamento delle acque ricircuitanti del sistema	40
3.3 Risoluzioni delle problematiche legate alla produzione massiva di fitocolture in sistema a circuito chiuso	41
3.3.1 Colture di microalghe: un piccolo ecosistema	41
3.3.2 Tecniche di allevamento	43
3.3.3 Ciclo di crescita algale (Fig.8)	44
3.3.4 Operazioni per le colture algali	45
3.3.5 Specie algali allevate	47
3.3.6 Terreno di coltura	49
3.3.7 Procedure inoculo colture	50
3.3.8 Conta cellulare con emocitometro 'manuale' (camera di Bürker)	51
3.3.9 Modulo di fito-zooplankton colture	53
3.3.10 Sterilizzazione attrezzatura	54
3.3.11 Qualità nutrizionali delle microalghe prodotte	55
3.3.12 Determinazione del contenuto proteico	55
3.3.13 Carboidrati	57
3.3.14 Determinazione del contenuto in acidi grassi polinsaturi	59

3.4 Sviluppo di protocolli per l'induzione ed il mantenimento della maturazione sessuale di molluschi bivalvi	60
3.4.1 Esperimenti di induzione della maturazione sessuale: specie <i>Mytilus galloprovincialis</i>	61
3.4.1.1 Stimolazione dell'emissione gametica indotta da parte degli organismi adulti	62
3.4.1.2 Raccolta, selezione e conservazione dei gameti	63
3.4.1.3 Fecondazione	64
3.4.1.4 Esame istologico	64
3.4.2 Esperimenti di induzione della maturazione sessuale: specie <i>Crassostrea gigas</i>	65
3.4.2.1 Ottenimento gameti di <i>Crassostrea gigas</i>	66
3.4.2.2 Valuzione del tasso di fecondazione	67
3.4.3 Mantenimento in stand-by di maturazione sessuale di organismi adulti della specie <i>Ostrea edulis</i>	67
3.4.3.1 Prelievo gameti	68
3.4.3.2 Valutazioni della qualità degli spermatozoi	69
3.4.4 Stabilizzazione a circuito chiuso di organismi adulti della specie <i>Pecten jacobaeus</i>	70
3.4.4.1 Prelievo e trasporto organismi adulti	70
3.4.4.2 Prelievo dei gameti	71
3.4.4.3 Valutazione della qualità degli spermatozoi	71
3.5 Sviluppo di protocolli per il mantenimento e l'allevamento di crostacei marini	71
3.5.1 <i>Amphibalanus amphitrite</i>	72
3.5.1.1 Allevamento	72
3.5.1.2 Alimentazione	73
3.5.1.3 Emissione naupliare	74
3.5.2 <i>Tigriopus fulvus</i>	74
3.5.2.1 Selezione di copepoditi per ottenimento di femmine ovigere sincronizzate	75
3.5.2.2 Selezione femmine ovigere	76
3.5.2.3 Allestimento TEST di alimentazione	76
3.5.2.4 Valutazione della produzione naupliare	77
3.6 Validazione dei protocolli gestionali e produttivi mediante valutazione della qualità dei gameti, embrioni e giovanili degli organismi allevati a circuito chiuso	78
3.6.1 Test di sviluppo a larva D di molluschi bivalvi	78
3.6.1.1 Termine del test	78
3.6.1.2 Conteggi	79
3.6.1.3 Endpoint	79
3.6.1.4 Accettabilità del test	80
3.6.2 Valutazioni della qualità degli spermatozoi di molluschi bivalvi	80
3.6.3 Test di sopravvivenza naupliare dei crostacei utilizzati	81
3.7 Analisi statistica	81

<b>Capitolo 4 Analisi dei Risultati e Discussioni</b>	82
4.1 Ottimizzazione della gestione delle acque nel sistema a ricircolazione idrica	83
4.1.1 Valutazione della qualità dei materiali utilizzati	83
4.1.2 Andamento dei parametri microbiologici e chimico-fisici	83
4.1.3 Individuazione delle fasi e dei tempi di trattamento	85
4.1.4 Controllo della qualità delle acque nel tempo	85
4.2 Risoluzioni delle problematiche legate alla produzione massiva di fitocolture in sistema a circuito chiuso	86
4.2.1 Curve di crescita in piccoli volumi dei tre ceppi di microalghe utilizzati	86
4.2.2 Confronto curva di crescita in grandi volumi del ceppo algale <i>Isochrysis galbana</i>	87
4.2.3 Medie dei parametri di crescita e dei valori nutrizionali delle microalghe lungo tutta la sperimentazione	88
4.2.4 Necessità produttive e produzioni reali	89
4.3 Sviluppo di protocolli per l'induzione ed il mantenimento della maturazione sessuale di molluschi bivalvi	89
4.3.1 Prove di maturazione sessuale a circuito chiuso di <i>Mytilus galloprovincialis</i>	89
4.3.2 Prove di maturazione sessuale a circuito chiuso di <i>Crassostrea gigas</i>	92
4.3.3 Mantenimento in standby pre-emissivo di maturazione della specie <i>Ostrea edulis</i>	93
4.3.4 Stabulazione a circuito chiuso di organismi adulti della specie <i>Pecten jacobaeus</i>	94
4.4 Sviluppo di protocolli per il mantenimento e l'allevamento di crostacei marini	95
4.4.1 <i>Amphibalanus amphitrite</i>	96
4.4.1.1 Valutazione della sopravvivenza degli adulti di <i>Amphibalanus amphitrite</i> in due linee di allevamento che utilizzano differenti acque	96
4.4.1.2 Miglioramento delle performance riproduttive mediante diete sperimentali	96
4.4.2 <i>Tigriopus fulvus</i>	97
4.4.2.1 Valutazione della sopravvivenza degli adulti di <i>Tigriopus fulvus</i> in due linee di allevamento che utilizzano differenti acque e miglioramento delle performance riproduttive mediante diete sperimentali	97
4.5 Validazione dei protocolli gestionali e produttivi mediante valutazione della qualità dei gameti, embrioni e giovanili degli organismi allevati a circuito chiuso	98
4.5.1 Confronto di sviluppo a larva D di embrioni di <i>Mytilus galloprovincialis</i>	98
4.5.2 Confronto sviluppo a larva D di embrioni di <i>Crassostrea gigas</i>	99
4.5.3 Andamento della motilità spermatica di organismi allevati in RAS messi a confronto con organismi naturali della specie <i>Ostrea edulis</i>	99
4.5.4 Andamento della motilità spermatica di organismi allevati in RAS messi a confronto con organismi naturali della specie <i>Pecten jacobaeus</i>	100
4.5.5 Confronto percentuali di sopravvivenza di naupli del cirripede <i>Amphibalanus amphitrite</i>	100

4.5.6 Confronto percentuali di sopravvivenza di naupli del copepode arparticoide <i>Tigriopus fulvus</i>	101
<b>Capitolo 5 Conclusioni</b>	102
<b>Bibliografia</b>	104

## ***Premessa***

A sostegno di ogni strategia che limita gli effetti e la portata dell'inquinamento ambientale, nella prospettiva di uno sviluppo sostenibile, c'è l'adozione di tecnologie produttive alternative che consentano di impiegare nel modo più razionale ed economico possibile le risorse (risorse primarie ed energia) e, al tempo stesso, di minimizzare la quantità di rifiuti e residui (gassosi, liquidi e solidi) connessi alle attività produttive.

Biologi, agronomi, 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.

Il "Centro interdipartimentale di ricerca per la gestione delle risorse idrobiologiche e per l'acquacoltura CRIAcq" dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, fin dalla sua istituzione nel 2000, ha avuto come missione programmatica la:

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

Tale scopo è stato perseguito mediante ricerche di base ed applicate nel campo dell'acquacoltura, per la valorizzazione di specie autoctone, e della gestione delle risorse idrobiologiche, mediante lo studio e la progettazione di soluzioni tecnologiche innovative volte a minimizzare gli effetti derivanti dai processi produttivi.

Tra le ricerche del CRIAcq c'è da sempre stato 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 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.

Proprio nella direzione di uno sviluppo ecosostenibile dell'acquacoltura, concepito per minimizzare gli impatti negativi (emissioni di nutrienti, consumo energetico, ecc.) e massimizzare le produzioni in termini qualitativi e quantitativi, il CRIAcq ha rivolto la propria attenzione agli impianti a circuito chiuso, progettandone e realizzandone diversi nei quali, accanto al ridotto consumo idrico, si è pensato a soluzioni per il totale recupero dei reflui.

Sistemi a circuito chiuso potrebbero rappresentare la strada preferenziale per la valorizzazione l'immenso potenziale genetico (autoctono e non) delle acque ancora oggi mal sfruttato sia nei Paesi industrializzati per rispondere alla crescente domanda di biomolecole funzionali sia nei quei Paesi in via di sviluppo dove l'acquacoltura potrebbe alleviare la cronica carenza di proteine.

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 studia nuove soluzioni per l'introduzione in ambiente controllato, 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 minimo;
- ✓ 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.

La crescente necessità di ottimizzare e differenziare le produzioni zootecniche ed agroalimentari ha portato il comparto della ricerca a sviluppare protocolli di potenziamento produttivo e di allevamento di nuove specie.

Tra le soluzioni più efficaci c'è una nuova tipologia di impianto intensivo a ricircolazione idrica (RAS) dove la depurazione e il riutilizzo delle acque di allevamento non solo riducono il consumo della risorsa idrica ma, limitando il rilascio di reflui nell'ambiente, rendono minimo l'impatto ambientale.

Le attività di ricerca legate al presente dottorato di ricerca hanno riguardato sia la mitigazione dell'impatto ambientale provocato dalla attività acquacolturale sia la definizione di protocolli per l'induzione alla maturazione sessuale di organismi marini utilizzati nel monitoraggio ambientale e per la conservazione di germoplasma al fine di contrastare l'impoverimento genetico delle specie allevate.

# Capitolo 1

## Introduzione

## 1.1 Produzioni acquacolturali e loro impatto ambientale

L'acquacoltura comprende molte e diversificate pratiche di allevamento rispetto alle specie (alghe, molluschi, crostacei, pesci ed altri organismi acquatici), all'ambiente ed ai sistemi utilizzati, offrendo un ampio ventaglio di possibilità per accrescere la produzione e il reddito in molte aree rurali e periurbane. La qualità dei prodotti è specchio delle modalità di allevamento, delle tecnologie impiegate e della risorsa idrica utilizzata. Un continuo processo di evoluzione ha portato oggi ad un'*acquacoltura* che ha lo scopo di produrre per soddisfare la crescente domanda che la pesca oceanica non può coprire; lo sviluppo di questo comparto è strettamente legato al potenziale ambientale (acqua, seme, superfici, mano d'opera) e alla domanda del mercato.

Questo settore non può sostituire del tutto la pesca, ma sicuramente avrà un ruolo progressivamente più importante nell'assicurare al mercato prodotti ittici con una notevole diversificazione di specie (sono oltre 220 le specie oggi allevate) e nella preservazione e ripopolamento delle acque interne ai fini della salvaguardia della biodiversità.

L'acquacoltura è un sistema di produzione caratterizzato da un processo di accrescimento estremamente rapido. 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.

Con una produzione mondiale di 50 milioni di tonnellate nel 2007, l'acquacoltura costituisce un importante settore produttivo, in continua espansione (ISMEA, dati FAO). Anche se il 50% delle produzioni riguarda la piscicoltura d'acqua dolce (con a livello europeo soprattutto salmonidi), settori quali la piscicoltura d'acqua di mare e la molluschicoltura hanno fatto registrare dal 2003 al 2007 incrementi produttivi (rispettivamente 39% e 14%). Le produzioni europee si caratterizzano per un'elevata tecnica ed un'attenzione sempre crescente per problematiche quali gestione delle acque, alimentazione artificiale, controllo della sincronizzazione delle deposizioni di uova, riproduzione artificiale, sterilizzazione del pesci per tripliodizzazione, selezione genetica, vaccini, etc (Maissé, et al, 1998).

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

Le aspettative produttive ed economiche del settore sono molte, ma si sono evidenziati anche numerosi aspetti negativi, specialmente dove tale attività è stata svolta in maniera poco responsabile (Cataudella, 2001). L'aumento nel numero di allevamenti ittici in Italia negli ultimi

20 anni sta creando una crescente preoccupazione per il loro possibile impatto ambientale, specialmente alla luce degli effetti sinergici con altre fonti di inquinamento antropico.

Il tema della sostenibilità ecologica è uno dei più dibattuti in campo e naturalmente non riguarda solamente l'acquacoltura, ma tutte quelle attività zootecniche che interagendo con l'ambiente possono provocare cambiamenti nell'ambiente stesso.

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

L'impatto ambientale negativo dell'acquacoltura è controllato e mitigato da una serie di norme e/o patti intesi a prevenire il degrado ambientale, inoltre anche la ricerca scientifica e lo sviluppo tecnologico possono fornire contributi positivi per prevenire o addirittura annullare gli effetti sull'ambiente.

### **1.1.1 Acquacoltura ecosostenibile ed ecocompatibile**

L'espressione sviluppo sostenibile compare per la prima 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: 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).

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 programmazione. 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 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, sfocato 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*. I tre vertici indicano la massimizzazione di un solo obiettivo. Le diverse combinazioni dei tre concetti 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.

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. 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.

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 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.

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.

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.

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 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. 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).

### **1.1.2 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 trotticoltura, 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 (trotticoltura 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. avannotterrie, 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.

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).

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

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.

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.

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.

## **1.2 Sistemi produttivi a ricircuitazione idrica (RAS)**

In tempi più recenti l'approccio per le produzioni acquacolturali è cambiato andando verso il :

⇒ *controllo della 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).

Si sono sviluppati impianti d'acquacoltura anche intensivi a ricircuitazione idrica dove la depurazione e il riutilizzo delle acque di allevamento non solo riducono il consumo della risorsa idrica ma, riducendo il rilascio di reflui nell'ambiente, rendono minimo l'impatto ambientale.

Infatti soluzioni tecnologiche in grado di abbattere o ridurre i fattori limitanti possono permettere il riutilizzo parziale o totale delle acque, altrimenti rilasciate nell'ambiente.

Negli impianti d'acquacoltura, che adottano il ricircolo, il principio della depurazione si basa sulla trasformazione dell'ammoniaca prodotta dai pesci allevati, in nitriti e successivamente in nitrati. Tale processo avviene mediante filtri biologici realizzati su sistemi a biomassa adesa caratterizzati da materiali ad elevata porosità e superficie ruvida, tali da facilitare e rendere massima la superficie di adesione del biofilm di trasformazione.

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.

La tecnologia della depurazione e del riuso delle acque di allevamento si è diffusa in tutto il mondo, specialmente nell'allevamento di specie precedentemente allevate *in estensivo*. Il sistema di depurazione in un impianto a ricircolo può essere composto da diverse subunità, ognuna avente un ruolo differente, come: filtri meccanici per il sedimento più fine; filtri biologici di diverso genere per le sostanze organiche tossiche disciolte; modulo di sterilizzazione per la carica batterica.

L'innovazione del processo produttivo acqua colturale sta tutto nell'utilizzo di tecnologie produttive a circuito chiuso che consentono il trattamento delle acque, per il riutilizzo da parte proprio di quegli organismi che hanno prodotto il refluo.

Questa tipologia di allevamento fornisce contemporaneamente concrete ed importanti risposte sulla bontà del sistema sia dal punto di vista produttivo che ecologico.

L'utilizzazione degli impianti a circuito chiuso, nonostante comporti un alto investimento per la progettazione e l'installazione, è legata alla necessità di ridurre l'impatto ambientale, fornendo un miglior utilizzo di acqua ed un maggior controllo sulle caratteristiche di produzione.

### **1.3 Stato dell'arte sulle produzioni in RAS**

Il sistema produttivo a ricircuitazione idrica (RAS), dove gli effluenti della produzione vengono biologicamente trattati e l'acqua viene riciclata tornando alle vasche di allevamento, può diventare una soluzione chiave per le grandi produzioni, ecologicamente sostenibili, di specie

ittiche.

Particolarmente importante l'utilizzo di questa tecnologia di allevamento in aree dove la fornitura dell'acqua e/o gli effetti dei carichi nutrizionali sugli ecosistemi acquatici circostanti limitano la portata attuale della produzione acquacolturale (Piedrahita,2003).

I modelli ragionevolmente validati su dati sperimentali in grado di fornire le generalità richieste dal RAS sono destinate a diventare un'importante strumento per la selezione di tecnologie capaci di produrre prodotti di qualità in maniera del tutto ecosostenibile.

La complessità del RAS sta proprio nelle interazioni tra il trattamento dell'acqua ed il giusto accrescimento degli organismi allevati che implica l'ottimizzazione di un progetto (configurazione, dimensioni, pesce, mangimi, i flussi ecc) che tenga conto dei costi di investimento e gestione, della stabilità della qualità delle acque e non meno banali i modelli dinamici dei componenti del sistema.

La necessità di un modello dinamico per una comprensione più profonda delle performance acquacolturali è stata identificata, e durante l'ultimo decennio c'è stata una chiara tendenza verso l'uso di modelli di analisi e di simulazione di acquacoltura. Molti di loro hanno la loro origine in modellistica ecologica e si applicano ai laghetti o altri sistemi senza processi di trattamento delle acque reflue (Jamu e Piedrahita, 2002;. Jimenez-Montealegre et al, 2002; Li e Yakupitiyage, 2003).

Spesso l'acqua biotratata di un impianto RAS non viene rinmessa nelle vasche di allevamento ma viene utilizzata in altre produzioni connesse all'alimentazione di molluschi, crostacei e teleostei (produzione di microalghe e allevamento di organismi zooplanctonti).

Vari progetti relativi alle policolture di pesci e molluschi sono stati effettuati da Gordin et al (1981), Shpigeland Fridtnan (1990), Trevor e Iwama (1991), Shpigel e Blaylock (1991) e Shpigel et al. (1993). Questi autori ed altri, hanno analizzato nel dettaglio gli effetti degli effluenti prodotti dalla coltura di pesce ad alta intensità di Eilat (Israele) sulla crescita e tassi di sopravvivenza di diverse specie di molluschi bivalvi, sottolineando la grande ricchezza di queste acque per le massive produzioni di microalghe.

Molti sono stati i sistemi di produzione integrati studiati da molti autori scientifici nel corso degli anni a livello internazionale, come il sistema integrato multi trofico di pesci, microalghe e molluschi studiato da Neori A. et al, 2000 *Sparus aurata-abalone*; oppure da Shpigel, M. et al,1996; ed altri.

## **1.4 Utilizzo di organismi acquatici, gameti ed embrioni in applicazioni ecologiche e criobiologiche.**

Il sistema Ras è molto utile anche per produrre e avere sempre a disposizione sistemi biologici da utilizzare nelle campagne di monitoraggio ambientale o in applicazioni criobiologiche per la conservazione di linee genetiche aventi caratteristiche specifiche.

Le produzioni in Ras, e quindi in ambiente confinato e condizionato, permettono di avere la continua disponibilità di sistemi biologici anche oltre la stagionalità dei cicli riproduttivi degli organismi presi in esame (gameti ed embrioni di specie acquatiche sentinella).

### **1.4.1 Monitoraggio ambientale**

La metodologia tradizionalmente utilizzata per la valutazione del rischio ambientale consiste nella ricerca diretta degli inquinanti mediante analisi chimico-fisiche. Le informazioni ottenibili in questo modo presentano però delle carenze, in quanto non permettono di registrare le tracce di episodi di degrado avvenuti precedentemente e, soprattutto, non danno una stima reale delle loro azioni tossiche sugli organismi viventi, che sono il risultato, innanzitutto, di effetti dei vari inquinanti (Chapman 2002 a 7-15, Chapman 2002b 271-278, Davoren 2005).

Qualsiasi sia il fine che spinge alla sorveglianza ed alla tutela di un determinato ambiente, è necessario l'utilizzo di adeguate metodologie di monitoraggio ambientale e di una corretta strategia di applicazione di queste metodologie (Burton 1999, Chapman 2002a 7-15, Chapman 2002b 271-278, Chapman 2008, D'Adamo 2008).

L'entrata in vigore nell'aprile 2006 del Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006, recante "Norme in materia ambientale" che recepisce la Direttiva 2000/60/CE, introduce sostanziali innovazioni in tema di monitoraggio e classificazione delle acque superficiali rispetto al decreto 152/1999.

Fermo restando l'obbligo di attuare il monitoraggio chimico-fisico, nel decreto del 2006 viene dato particolare rilievo all'importanza del monitoraggio mediante l'utilizzo di indicatori biologici e viene ampliato il numero di specie (fitoplancton, fitobentos, fauna ittica) che possono essere utilizzate nelle indagini ecotossicologiche.

Ancora decisamente carente è, invece, rimasta la normativa riguardante l'uniformazione e la standardizzazione dei vari protocolli utilizzabili per il monitoraggio. Le diverse istituzioni nazionali ed internazionali presenti sul territorio, infatti, utilizzano metodiche, protocolli di raccolta e misura di campioni ambientali tra loro molto diversificati (APAT, ASTM, ISO, OECD, OSPAR, USEPA EPA). Una mancanza di uniformità si registra anche a livello della

selezione di organismi bioindicatori e dei relativi protocolli sperimentali di esecuzione dei test, così che una valutazione rapida ed oggettiva del rischio ambientale non è ad oggi ancora garantita.

I saggi di tossicità rappresentano un utile strumento per l'identificazione precoce di situazioni di rischio per il biota, in quanto permettono di evidenziare gli effetti causati dall'insieme degli inquinanti biodisponibili nell'area considerata mediante misure replicate, in specie target scelte in base all'importanza che rivestono nell'ecosistema considerato e/o in base alla loro sensibilità (Nascimento 2000, Nipper 1993).

I saggi di tossicità, infatti, permettono una rapida valutazione della frazione biodisponibile di inquinanti, anche a basse concentrazioni, tenendo conto nel contempo anche degli effetti additivi, sinergici e/o antagonisti di tutte le componenti che interagiscono con il biota (Fabbrocini 2005, Macken 2009, Narracci 2009, Nipper 1993).

La scelta degli organismi (indicatori biologici) più idonei per un saggio di tossicità deve tenere conto di numerosi fattori, tra cui sensibilità e affidabilità, distribuzione e rilevanza ecologica della specie, disponibilità nell'arco dell'anno. Inoltre, un saggio ecotossicologico deve prevedere "endpoints" che possano essere misurati in maniera il più possibile riproducibile, oggettiva, accurata e rapida (Chapman 2002a 7-15, Chapman 2002b 271-278).

La capacità riproduttiva costituisce un indicatore sensibile per la sopravvivenza di una specie e può quindi risultare anche un utile parametro per valutare il rischio ambientale indotto da fenomeni di contaminazione chimica. In effetti, grazie alla loro elevate sensibilità, gameti ed embrioni di organismi acquatici sono comunemente utilizzati nei test ecotossicologici, (Embry 2010, Masullo 2008, Raisuddin 2007, Greco 2006, Volpi Ghirardini 2005, Micheletti 2004, Bellas 2001, Gelli 2001, Au 2000, Lam 2000, His 1999, Pagano 1986) e per valutare la qualità biologica delle acque e dei sedimenti in aree soggette ad effetti antropici (Kerr 1972).

Gli effetti di molte sostanze tossiche sulla motilità spermatica e sulla capacità di fecondazione e sviluppo larvale sono stati studiati in molte specie (Abascal 2007, Arizzi Novelli 2002, Beirae e Bellas 2008, Filosto 2008, Losso 2007a, Pagano 1993, Pagano 2002, Warnau 1996, Yokota 2001).

Studi di spermiossicità sono stati ampiamente effettuati su numerosi sistemi biologici, confermando l'elevata sensibilità ai contaminanti testati degli spermatozoi di differenti specie acquatiche (Gopalakrishnan et al, 2008, KIME 1996, Lahnsteiner et al 2004, Lera 2006, Rosety 2003, Rurangwa 2002).

La sensibilità dei primi stadi di sviluppo di ricci e bivalvi a contaminanti in tracce è stata ampiamente studiata (Arizzi Novelli 2003, Beiras e his 1994 e1995, dinnel 1988, his 1997, Losso 2004, Martin 1981, Pagano 1986, Pagano 1996, Vashchenko 1995, Warnau 1996).

L'embriogenesi fornisce risposte dose-dipendenti adatte alle prove di tossicità. In particolare prove di tossicità embrionale a metalli hanno dimostrato che lo stadio di gastrula costituisce la fase più delicata per lo sviluppo di invertebrati marini come ascidie (Cima et al., 1996; Bellas 2001), ma anche al bivalvi (Calabrese et al., 1973; sua e Robert, 1982) e ricci di mare (Vlasova e Khristoforova, 1982).

In effetti l'utilizzo degli embrioni di invertebrati marini per il monitoraggio degli ecosistemi acquatici è ampiamente diffuso e riconosciuto a livello internazionale (ICES 1997); protocolli standardizzati per stadi embrionali di echinoidi e molluschi sono stati messi a punto ed utilizzati (ASTM 1995, ASTM 1998, ).

L'embriotossicità nei pesci (FET fish embryo toxicity) può essere una valida alternativa proposta in sostituzione al test acuto **sugli avannotti di** pesci. La sua applicazione nelle valutazioni ambientali a livello globale sembrerebbe necessaria. Su questa problematica nell'ambito di un seminario internazionale tenuto recentemente (2008) dal Centro europeo di ecotossicologia e tossicologia delle sostanze chimiche (ECETOC) è stato siglato un accordo fondamentale per includere gli eleuteroembrioni di pesci nella/per la valutazione del rischio ambientale acquatico; inoltre sono stati identificati gli endpoint rilevanti e addizionali che potrebbero migliorare i test di tossicità acuta. Il test con embrioni di pesci non è stato, tuttavia, ancora convalidato OCSE. Un passo importante sarà quello di fornire indicazioni su come tutti i test di/con embrioni e gameti di pesce possono essere utilizzati per valutare il rischio chimico e armonizzare le metodiche utilizzate in diverse linee direttrici adottate nel corso degli ultimi decenni. L'uso del test nel contesto delle valutazioni degli effluenti è stata deliberato e bisogna stabilire se gli embrioni di pesce sono sufficientemente sensibili da soli per essere considerati alternative valide ai test su post-larve. (Embry, S.E. ET AL 2010)

Molto spesso la sola sopravvivenza all'esposizione non è un indice ben predittivo del rischio ambientale; il sistema biologico sopravvissuto all'esposizione può infatti aver subito alterazioni non immediatamente riscontrabili. Pertanto è importante associare alla determinazione del tasso di sopravvivenza anche uno o più "endpoint" subletali quali risposte fisiologiche e cellulari.

Nei test di tossicità è utilizzata una grande varietà di "endpoint" (ANZECC 1992), suddivisibili in tre tipologie: funzioni vitali (mortalità, alterazioni della riproduzione, schiusa, immobilizzazione e inibizione della crescita), "endpoint" comportamentali (mobilità, motilità,

velocità di infossamento, velocità di ventilazione, velocità di nuoto, risposte fototattiche e tasso di alimentazione) ed “endpoint” biochimici (inibizione della bioluminescenza, induzione e attività di diversi enzimi - compresi citocromo P-450, EROD, acetilcolinesterasi e metallotioneine-, cambiamenti del DNA e del rapporto DNA/RNA, lesioni istopatologiche e disfunzioni del sistema immunitario. Tra questi gli “endpoint” funzioni vitali sono considerati gli unici con una rilevanza diretta per l'ecosistema e sono perciò attualmente gli indici più utilizzati nei protocolli standardizzati (OECD 1992a, Holdway 1996b; McCarty e Munkittrick, 1996)

In conseguenza di ciò raramente per azioni di monitoraggio sono proposti in modo integrato sia i target strategici, quali i gameti e gli embrioni con "endpoint" quali deformazioni e mortalità, che le risposte fisiologiche e cellulari (metallo-tioneine, stress protein, citocromi, lisosomi, motilità sia di gameti che di sistemi embrionali) (Vernberg 1972).

Da questo punto di vista può giocare un ruolo importante l'utilizzo dell'apoptosi, una forma di morte cellulare programmata che coinvolge singole cellule (Kerr 1972), si verifica in modo ordinato e regolato, richiede energia (Tatsumi 2003) e svolge un ruolo fondamentale durante lo sviluppo embrionale e nel mantenimento dell'omeostasi tissutale risultando, in definitiva, essenziale per il benessere dell'organismo. Il processo di apoptosi rappresenta anche una risposta di difesa a condizioni di stress cellulare (mancanza di nutrienti, stress ossidativo, ipossia, etc), all'attacco da parte di agenti fisici (radiazioni) e, naturalmente, chimici quali appunto gli xenobiotici.

Recenti studi, a tal proposito, hanno dimostrato che effettivamente in molti invertebrati (Micic 2001, Poulet, 2003) e nei vertebrati (Piechotta 1999, Rey 2009) gli inquinanti inducono fenomeni apoptotici.

Nella messa a punto di un protocollo sperimentale che possa fungere da saggio ecotossicologico facilmente applicabile e ripetibile è necessario valutare, non solo l'effettivo grado di sensibilità ai diversi contaminanti del sistema biologico preso in esame, ma anche la disponibilità di tale sistema per l'esecuzione di saggi lungo tutto l'arco dell'anno.

Inoltre nelle sperimentazioni di criopreservazione la motilità degli spermatozoi e la vitalità embrionale di vari organismi acquatici hanno mostrato una buona correlazione tra effetti delle sostanze crioprotettive che sono sostanze xenobiotiche e parametri fisiologici che caratterizzano la motilità, come capacità di attivazione, velocità, durata, percentuali di spermatozoi (**RVL) rapidi, vigorosi e lineari** caratterizzati dal migliore pattern di motilità (Fabbrocini 2000) e capacità fecondante.

Pertanto i sistemi criopreservati, rappresentati sia da spermatozoi che da embrioni a vari stadi nei differenti organismi acquatici, possono essere considerati dei buoni indicatori biologici da utilizzare per effettuare saggi ecotossicologici rispondendo a tutti i requisiti richiesti: disponibilità continua; correlazione effetti xenobiotici-rischio ambientale; omogeneità di campioni utilizzabili; test rapidi, semplici e riproducibili.

#### **1.4.2 Criobiologia**

La crescente necessità di ottimizzare e differenziare le produzioni zootecniche ed agroalimentari ha portato il comparto della ricerca a sviluppare protocolli di potenziamento riproduttivo e di allevamento di nuove specie.

Tra le scienze biotecnologiche riproduttive, la criopreservazione costituisce uno strumento essenziale per contrastare l'impoverimento genetico delle specie allevate (Nicholas, 1996), indotto dal crescente utilizzo di incroci, ma anche tecniche di inseminazione artificiale, superovulazione, produzione embrionale in vitro e trasferimento embrionale, introdotti per il potenziamento produttivo.

La criopreservazione permette campagne di incroci tra popolazioni e scambi internazionali di cellule germinali e lo stoccaggio di gameti di organismi geneticamente selezionati per la produzione, poi utilizzabili per campagne di fecondazione artificiale. Oggi, tecniche di criopreservazione per gameti animali domestici sono ampiamente conosciute ed applicate commercialmente (Fahning et Garcia, 1992).

Tra le innumerevoli applicazioni che essa fornisce vi sono:

- potenziale aumento dell'efficienza di allevamento di specie geneticamente perfezionate con tecniche di selezione e manipolazione genetica (Lubenz et al., 1997);
- supporto alle applicazioni dell'ingegneria genetica nell'allevamento, mediante il mantenimento di genotipi selvatici utilizzabili dai selezionatori come riferimenti genetici iniziali, permettendo un ritorno ai ceppi di partenza in caso di una eventuale selezione fortuita di un carattere indesiderato (Maissé et al., 1998) o in caso di disastri naturali o incidenti con improvvisi fenomeni di massiccio inquinamento ambientale o imprevista diffusione di patologie (Chao & Liao, 2001);
- disponibilità continua di gameti ed embrioni oltre le normali stagioni riproduttive e possibilità di superare il problema di asincronia di deposizione di gameti tra i sessi;
- facile accessibilità al seme che consente di sfruttare al meglio materiale genetico maschile senza dover tener conto della localizzazione del riproduttore;

- utilizzo di embrioni crioconservati come dieta alternativa per larve di specie ittiche di interesse commerciale (Chao et Liao, 2001);
- facilità ed economicità di trasporto di gameti ed embrioni anche su lunghe distanze.

Il miglioramento genetico e la conservazione di linee genetiche pure costituiscono due esigenze attuali del settore acquacolturale. Inoltre vi è una richiesta di biotecnologie in grado di contrastare problemi quali bassi tassi di crescita, alta mortalità, diffusioni frequenti di malattie, degradazione dell'ambiente, crescente richiesta da parte del mercato (Chao e Liao, 2001).

Per tutte queste problematiche la criopreservazione costituisce un valido strumento di contrasto a supporto delle attività degli allevatori.

Negli ultimi anni, in effetti, l'utilizzo di tale biotecnologia si sta lentamente espandendo anche alla produzione acquatica (Fabbrocini et al, 2000): la crioconservazione di spermatozoi è stata sperimentata con successo per molte specie ittiche e protocolli di criopreservazione su larga scala sono stati testati per specie d'acqua dolce e marine.

Nell'ambito dei molluschi studi sulla messa a punto di protocolli di criopreservazione sono stati svolti per un numero limitato di specie, come *Crassostrea gigas* (Ieropoli et al 2004 + Bourgrier 1986 + Staeger 1974 + Yankson & Moyse 1991 + Smith et al 2001 + Van der Horst et al 1985), *Crassostrea virginica* (Zell et al 1979, Paniagua-Chavez et Tiersh 2001), *Saccostrea cucullata* (Yankson & Moyse 1991), *Crassostrea iredalei* (Yankson & Moyse 1991), *Crassostrea tulipa* (Yankson & Moyse 1991), *Pinctada fucata martensii* (Kawamoto et al 2007, Narita et al 2008), *Pinctada margaritifera* (Acosta-Salnon et al 2007), *Mytilus galloprovincialis* (Di Matteo, 2009), *Haliotis diversicolor supertexta* (Gwo et al 2002).

L'industria acquacolturale ed enti stanno iniziando ad utilizzare tale tecnologia per stoccare sperma di riproduttori ed allestire banche criogeniche di sperma di organismi selvatici per scambi internazionali di campioni (Chao et Liao, 2001).

Per ovociti ed embrioni, invece, lo studio di protocolli di crioconservazione è ancora in una fase iniziale e c'è ancora molto lavoro da fare affinché la pratica di crioconservazione di questi sistemi biologici possa diventare realmente applicativa (Chao et Liao, 2001).

Per mantenere un alto livello di diversità genetica in una popolazione dovrebbe essere creato un gran numero di riserve selvatiche, uno per ogni popolazione geneticamente differenziata. Tale soluzione non è realistica né per il costo né per l'area necessaria. Così, la creazione di una banca di sperma criopreservato potrebbe costituire una soluzione alternativa per preservare i pool genetici selvatici e quindi uno strumento molto prezioso per la conservazione di specie a rischio

di estinzione, poiché fornisce l'opportunità di preservare campioni rappresentativi e ulteriormente ricostruire il ceppo originario, popolazione o varietà (Martínez-Páramo et al 2009).

I gameti stoccati in azoto liquido infatti possono poi essere utilizzati in campagne di ripopolamento mediante procedure di fecondazione in vitro.

Negli ultimi anni l'applicazione di tecniche di criopreservazione è stata estesa anche al germoplasma vegetale: l'efficacia di questa tecnica è stata dimostrata in prove di laboratorio su numerose specie portando a considerare lo stoccaggio in azoto liquido come l'unica tecnica attualmente disponibile in grado di assicurare una reale conservazione a lungo termine e affidabile in ogni situazione. Tale tecnica è indicata nel caso di alcuni semi recalcitranti, di specie che si propagano vegetativamente, di specie rare, minacciate o in pericolo di estinzione, così come di prodotti biotecnologici di alto livello come quelli costituiti dalle linee cellulari di estrazione farmacologica, cloni selezionati o materiale geneticamente modificato (Engelmann, 2004; González-Benito, 1998; Harvengt *et al.*, 2004, Hirano *et al.*, 2005; Panis *et al.*, 2001).

L'utilizzo di tale biotecnologia si sta quindi estendendo anche al settore agricolo, con l'istituzione di banche di semi e gemme vegetative per la conservazione delle risorse genetiche vegetali (Hirano et al, 2005; Popov et al, 2006; Ozden-Tokatli et al, 2010).

Inoltre nelle sperimentazioni di criopreservazione la motilità degli spermatozoi e la vitalità embrionale di vari organismi acquatici hanno mostrato una buona correlazione tra effetti delle sostanze crioprotettive che sono sostanze xenobiotiche e parametri fisiologici che caratterizzano la motilità, come capacità di attivazione, velocità, durata, percentuali di spermatozoi (RVL) rapidi, vigorosi e lineari caratterizzati dal migliore pattern di motilità (Fabbrocini 2000) e capacità fecondante.

Pertanto i sistemi criopreservati, rappresentati sia da spermatozoi che da embrioni a vari stadi nei differenti organismi acquatici, possono essere considerati dei buoni indicatori biologici da utilizzare per effettuare saggi ecotossicologici rispondendo a tutti i requisiti richiesti: disponibilità continua; correlazione effetti xenobiotici-rischio ambientale; omogeneità di campioni utilizzabili; test rapidi, semplici e riproducibili.

Procedure di criopreservazione sono state messe a punto per spermatozoi di numerose specie di organismi acquatici (Di Matteo 2009, Gwo 2000, Drokin 2006, Sarvi k. 2006, Jeropoli 2004, Sansone 2002, Linhart 2000, ) nonché per larve trocofore di molluschi bivalvi (Smith 2001, Paniagua-Chavez 2001, Chao 1997, Gwo 1995). I sistemi biologici criopreservati possono perciò costituire dei possibili bioindicatori disponibili indipendentemente dalle stagioni riproduttive delle singole specie.

Capitolo 2

Scopo della Ricerca

e

Piano Sperimentale

## 2.1 Scopo della Ricerca

Il lavoro oggetto di questa sperimentazione è stato incentrato sulle produzioni di organismi marini in sistemi a circuito chiuso (RAS – Recirculating Aquaculture System) al fine di validare tale sistema produttivo e di permettere la continua disponibilità di gameti, embrioni e giovanili degli stessi organismi.

Inoltre la continua disponibilità di questi sistemi biologici permetterebbe anche l'esecuzione di test ecotossicologici oltre i periodi di disponibilità naturale legati alla stagionalità riproduttiva delle specie utilizzate. Gli organismi marini così prodotti possono trovare impiego applicativo nei vari settori a cui la missione del CRIAcq fa riferimento: produzioni acquacolturali, quali larviculture di varie specie di molluschi, pesci e crostacei marini; studi biotecnologici come la criopreservazione di gameti ed embrioni; ambiente, quale strategia di supporto alla difesa della biodiversità e azioni di biomonitoraggio per la gestione, il controllo e la salvaguardia degli ecosistemi acquatici.

## 2.2 Piano Sperimentale

Il progetto di ricerca è stato articolato in cinque fasi sperimentali che hanno riguardato diverse tipologie di ricerche eseguite nel corso dei tre anni su differenti organismi marini:

I. Ottimizzazione della gestione delle acque nel sistema a ricircuitazione idrica:

Nell'ambito di tale fase acqua prelevata nel golfo di Salerno è stata gestita e trattata, per tutto l'arco delle sperimentazioni (circa 24 mesi), mediante stoccaggio temporizzato nelle diverse vasche di trattamento. In particolare è stata scelta la modalità di gestione delle acque a "pacchetti" (quantità definite di acque ricircuitanti, differenziate e stoccate per le differenti necessità del programma sperimentale).

La qualità dell'acqua è stata monitorata periodicamente mediante indagini microbiologiche ed ecotossicologiche.

II. Risoluzioni delle problematiche legate alla produzione massiva di fitocolture in sistema a circuito chiuso:

In questa fase sono state allestite delle colture fitoplanctoniche intensive a volume crescente in ambiente controllato, utilizzando l'acqua del sistema di ricircuitazione.

I ceppi di microalghe utilizzate per tutta la sperimentazione sono stati *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* e *Chaetoceros calcitrans*, l'effettiva concentrazione algale nelle colture veniva monitorata quotidianamente, per il controllo delle curve di crescita algali lungo tutto il periodo di sperimentazione. Inoltre venivano monitorati bimestralmente,

mediante analisi biochimiche, i valori nutrizionali delle colture algali per valutarne eventuali alterazioni lungo l'arco della sperimentazione.

III. Sviluppo di protocolli per l'induzione ed il mantenimento della maturazione sessuale di molluschi bivalvi:

Sono state condotte prove di alimentazione su quattro specie di molluschi bivalvi (*Mitylus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea Edulis* e *Pcten jacobaeus*), utilizzando miscele di microalghe, per l'induzione della maturazione sessuale e/o per il suo mantenimento e la stabulazione di organismi in uno stato di stand-by pre-emissivo dei gameti.

*Mitylus galloprovincialis*: un lotto omogeneo di organismi, prelevati presso allevamenti locali, è stato diviso in tre gruppi da 50 organismi e sottoposti a tre differenti diete per circa 50 giorni. La valutazione dello stato di maturazione sessuale è stato eseguito con periodici campionamenti di organismi per la conduzione di indagini istologiche e per stimolazioni, mediante shock termici ed osmotici, all'emissione gametica naturale per poi valutarne la capacità fecondante.

*Crassostrea gigas*: un lotto omogeneo di organismi, provenienti da allevamenti francesi, è stato diviso in due gruppi da 30 organismi e sottoposti a due differenti diete. La valutazione dello stato di maturazione sessuale è stato eseguito con periodici campionamenti di organismi da cui sono stati biotticamente prelevati i gameti utilizzati per prove di fecondazione messe a confronto con organismi allevati in mare.

*Ostrea Edulis*: organismi provenienti da allevamenti Bretoni in uno stato di maturazione sessuale avanzato sono stati stabulati a circuito chiuso per circa 5 mesi, alimentati con una dieta standard e mantenuti in una fase di standby pre-emissivo di maturazione. Gli organismi venivano periodicamente campionati per valutare l'effettivo stadio di maturazione effettuando prelievi biottici di spermatozoi, valutandone la qualità attraverso lo studio dei parametri della motilità.

*Pecten Jacobaeus*: organismi provenienti dalle coste dell'Adriatico sono stati stabulati in RAS, per la prima volta, a circuito chiuso per circa 1 anno, alimentati con una dieta standard e mantenuti in una fase di standby pre-emissivo di maturazione. Gli organismi venivano periodicamente campionati per valutare l'effettivo stadio di maturazione effettuando prelievi biottici di spermatozoi, valutandone la qualità attraverso lo studio dei parametri di motilità.

IV. Sviluppo di protocolli per il mantenimento e l'allevamento di crostacei marini di interesse ambientale:

Nell'ambito di questa fase sono stati allestiti allevamenti in piccoli volumi di due specie di crostacei (*Balanus amphitrite* e *Tigriopus fulvus*) necessari per l'esecuzione di saggi ecotossicologici per la valutazione della qualità delle acque.

*Amphibalanus amphitrite*: Sono state condotte stabulazioni in parallelo utilizzando per due diverse acque di allevamento. Per gli organismi allevati con acqua del sistema RAS sono state sperimentate diete differenti e ne è stato valutato l'effetto mediante la valutazione della quantità dei naupli prodotti da ogni adulto.

*Tigriopus fulvus*: Sono state condotte stabulazioni in parallelo utilizzando due diverse acque di allevamento. Per gli organismi allevati con acqua del sistema RAS sono state sperimentate diete sperimentali e ne è stato valutato l'effetto mediante la valutazione della quantità dei naupli prodotti da ogni femmina adulta ovigera.

V. Validazione dei protocolli gestionali e produttivi mediante valutazione della qualità dei gameti, embrioni e giovanili degli organismi allevati a circuito chiuso:

Tale fase sperimentale viene esplicata mediante confronti di qualità dei gameti, embrioni e organismi giovanili prodotti in RAS con organismi presi in natura per valutare l'effettiva validità degli allevamenti condotti a circuito chiuso che hanno utilizzato la stessa acqua (opportunamente trattata) per tutto il periodo di sperimentazione.

# Capitolo 3

## Materiale e Metodi

### 3.1 Descrizione Stazione Sperimentale di Salerno del CRIAcq

L'impianto pilota a circuito chiuso, installato presso la Stazione Sperimentale di Salerno (Fig.1) del CRIAcq ( Centro Interdipartimentale di Ricerca per la Gestione delle Risorse Idrobiologiche e per l'Acquacoltura), dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, 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.

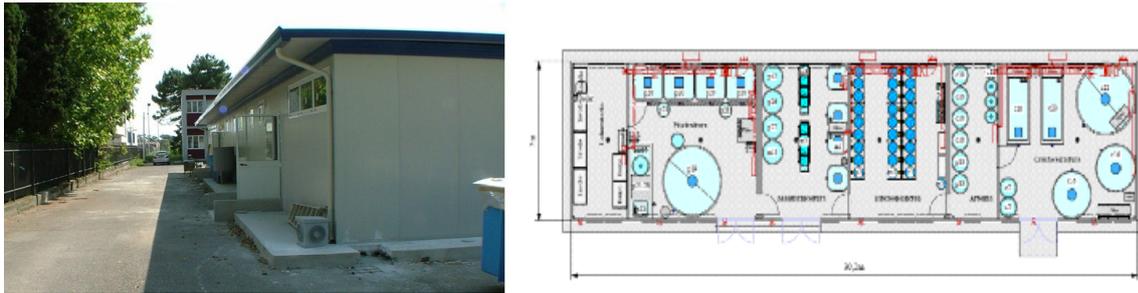


Fig.1: Visione esterna della Stazione Sperimentale di Salerno del CRIAcq; Schema interno.

L'acqua prelevata nel Golfo di Salerno avente le seguenti caratteristiche chimico-fisiche (Tab.1):

ACQUA DEL GOLFO DI SALERNO	
Temperatura	18±2 °C
Salinità	38 ‰
Ossigeno disciolto	6,8 ppm
CO <sub>2</sub>	185 ppm
pH	7.4
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (ppm)	0,345
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ppm)	0,15
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	16,5
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (ppm)	19,4

Tab1: Caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua prelevata nel Golfo di Salerno.

una volta giunta all'impianto, da due cisterne di 4000 l poste esternamente in un apposito container, viene filtrata e pompata tramite condutture ai vari moduli, ognuno dei quali è completamente autonomo ed è dotato di un proprio impianto di depurazione delle acque caratterizzato da un sistema articolato di filtri meccanici, biologici e lampade UV.

L'impianto è costituito da:

1. Un laboratorio attrezzato;
2. Un modulo per la valorizzazione maricolturale di specie ittiche marine mediterranee costituito da una avannotteria e da una vasca per la stabulazione dei riproduttori;
3. Un modulo molluschicoltura costituito da un impiantino per la larvicoltura ed un impianto per la stabulazione degli adulti ;
4. Un modulo di fitozooplanctoncoltura per la produzione massiva di microalghe ed organismi zooplanctonti;
5. Un impianto sperimentale per la valorizzazione maricolturale di crostacei decapodi;
6. Una sala gruppi elettrogeni, pompe e serbatoi per lo stoccaggio di grossi volumi di acqua di mare.

### **3.2 Ottimizzazione della gestione delle acque nel sistema a ricircolazione idrica**

L'obiettivo principale di questa fase sperimentale è proprio la totale gestione e riutilizzo della risorsa acqua all'interno del nostro sistema di allevamento a circuito chiuso.

#### **3.2.1 Sistema di trattamento delle acque**

Il trattamento di depurazione comincia con lo stoccaggio di tutte le acque residue della produzione in una vasca circolare in vetroresina del volume di 15 m<sup>3</sup> rifinita internamente ed esternamente in gelcoat isoftalico paraffinato (Fig.2).



Fig.2: Vasca di raccolta acqua

In seguito il lotto d'acqua necessario per le sperimentazioni viene trasferito in un filtro meccanico-biologico così costituito (Fig3):

- vasca di accumulo rettangolare da 3 m<sup>3</sup>
- filtro meccanico a tamburo con pompa assiale per il controlavaggio, filtro a cartuccia per acqua di lavaggio con manometro e collettore di scarico in PVC

- cilindro denitrificatore a risalita d'acqua con supporto filtrante di tipo misto
- filtro biologico a percolazione riempito con spugne di poliuretano espanso e bioring con rapporto di almeno 250 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, aerato controcorrente per la liberazione della CO<sub>2</sub> del volume di 1 m<sup>3</sup>
- uno schiumatoio



Fig.3: A Filtro a tamburo; B filtro biologico a percolazione

In fine l'acqua viene trasferita nel modulo di sterilizzazione costituito da una vasca di vetroresina autopulente con volume operativo di 1 m<sup>3</sup> collegata a 3 filtri meccanici a cartuccia, 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.



Fig.4: A lampade UV; B filtro meccanico a cartucce

Alla fine del percorso dei trattamenti l'acqua veniva filtrata meccanicamente, durante il trasferimento, con filtri a cartucce di porosità diversa in base all'utilizzo (1micron per le colture algali e 10 micron per l'acqua di allevamento molluschi e crostacei).

### 3.2.2 Parametri chimico-fisici

Per verificare il funzionamento del percorso di trattamenti veniva 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) ed il sensore termico dell'ossimetro (OXYCON), immergendo le sonde direttamente nelle vasche.

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.

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. La salinità viene espressa in parti per mille ed è misurata mediante rifrattometro (Salt Refractometer Modello 106 ATC prodotto dalla SPER Scientific).

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>, espressi in mg/l (Fig5).



Fig5: Attrezzatura per il monitoraggio dei parametri chimico-fisici: sonda multiparametrica; ossimetro; salinometro; spettrofotometro.

### 3.2.3 Analisi microbiologiche delle acque

Periodicamente venivano effettuate indagini microbiologiche sulle acque contenute nelle diverse vasche di trattamento ed allevamento. 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 circa 15 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:

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

### 3.2.4 Indagini ecotossicologiche

La qualità delle acque e dei materiali utilizzati per le sperimentazioni, veniva valutata mediante saggi di sviluppo di embrioni di *Paracentrotus lividus*, sottoponendo embrioni di (ricci di mare) alle diverse acque stoccate nelle differenti vasche di trattamento e valutandone il normale sviluppo 60h dopo la fecondazione. A seguito dell'incubazione degli embrioni alle più opportune condizioni le larve sono state fissate mediante aggiunta di formalina al 40% e campioni random di 100 larve sono stati osservati al microscopio per registrare la presenza di stadi larvali normoformati, in base a simmetria, forma, dimensione.

Per la valutazione sono state utilizzate come riferimento le classificazioni riportate da His et al, 1999 (Fig.6).

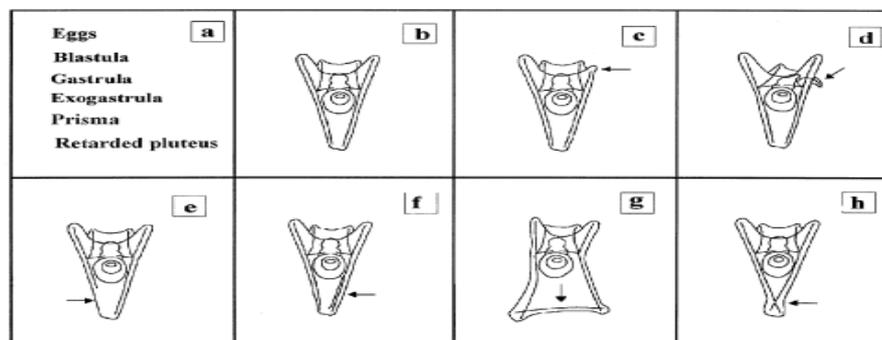


Fig.6: Da His et al, 1999. Differenti anomalie in plutei di *Paracentrotus lividus* in accordo, rispettivamente, con His et al. (1997) e Klöckner et al. (1985). (a) vari stadi di sviluppo deformati o ritardati da uova a plutei a due braccia, (b) plutei normali, (c) braccia post-orali di lunghezza diversa, (d) asta orale ruotata a destra, (e) mancanza di porzioni dell'asta destra del corpo, (f) asta sinistra del corpo raddoppiata, (g) sta del corpo addizionale posta trasversalmente, (h) asta del corpo incrociata apicalmente.

### 3.2.5 Gestione e trattamento delle acque ricircuitanti del sistema

Una volta andati a pieno regime produttivo l'acqua di lavaggio delle vasche di allevamento molluschi e tutte le altre acque di residuo delle produzioni algali venivano depurate mediante lo stoccaggio temporizzato dei differenti lotti d'acqua nelle diverse vasche di trattamento.

In particolare è stata scelta la modalità di gestione delle acque a "pacchetti" (quantità definite di acque reflue, prodotte in Ras, diversamente trattate e stoccate per le differenti necessità del programma produttivo).

All'interno del nostro sistema di ricirculazione idrica (sistema Ras) l'acqua effettua un percorso ben preciso che passa attraverso una prima fase di raccolta e sedimentazione, poi staziona in una vasca contenente un grosso filtro meccanico (a tamburo) e biologico (a percolazione e sommerso

a letto fluido) dopodiché viene trasferita nell'ultima vasca di trattamento di sterilizzazione fisica (lampade UV) dove l'acqua ricircula su se stessa per un tempo definito.

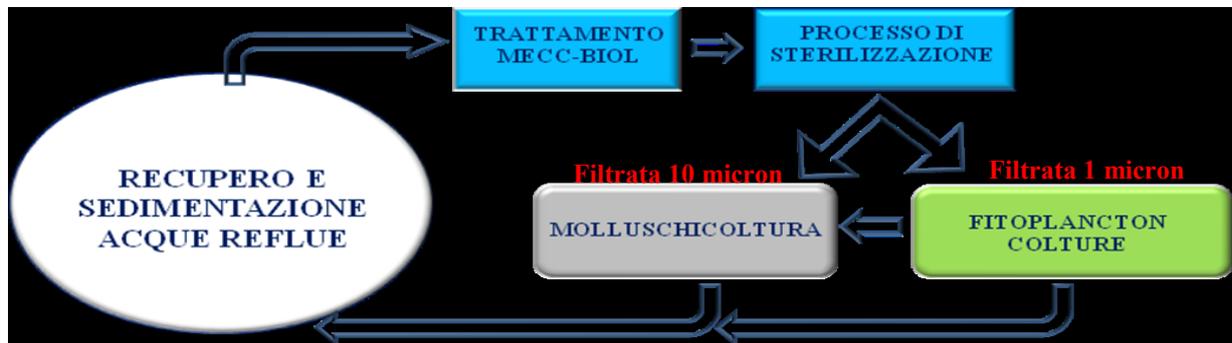


Fig.7: Schema del circuito dei trattamenti ed utilizzo delle acque

### 3.3 Risoluzioni delle problematiche legate alla produzione massiva di fitocolture in sistema a circuito chiuso:

In questa fase sono state allestite colture fitoplanctoniche intensive a volume crescente in ambiente controllato, utilizzando l'acqua proveniente dal sistema di ricircuitazione.

#### 3.3.1 Colture di microalghe: un piccolo ecosistema

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 l'allevamento di semi o il mantenimento dei riproduttori.

Una coltura algale costituisce un piccolo ecosistema: 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*).

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.

### 3.3.2 Tecniche di allevamento

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 inocolata 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.

### 3.3.3 Ciclo di crescita algale

In riferimento alle alghe si possono descrivere 4 stadi di crescita, così suddivisi (Fig.8):

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.



Fig.8: Fasi di crescita delle colture algali

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.

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. Successivamente, man 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 man mano che aumenta la densità della coltura.

### 3.3.4 Operazioni per le colture algali

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, in volumi superiori ai 50 l effettuata in *fotobioreattori* di varia natura (in genere sacchi in PVC o polietilene trasparenti).

Tale ciclo prevede:

- ⇒ *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.
- ⇒ *Colture di partenza o starter*: inoculi in piccoli volumi (beute da 250 ml) e condizioni ambientali tali da favorirne la rapida crescita.
- ⇒ *Produzione di alghe su piccola scala*: inoculi in volumi intermedi (bocce da 1 - 5 l) e condizioni ambientali tali da favorirne la rapida crescita.
- ⇒ *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*).

⇒ *Controllo della crescita e delle condizioni algali.*

⇒ *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.

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.

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.

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.

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.

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.

### 3.3.5 Specie algali allevate

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



***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.



***Isochrysis galbana*** è un piccolo flagellato mobile unicellulare (3-6  $\mu\text{m}$ ) la cui colorazione verde/marrone è dovuta ai pigmenti fotosintetici clorofilla *a* e *c*, *fucoxantina*,  *$\beta$ -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 cellulosica. 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 *C. calcitrans*), 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*, *copepod*i 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.



***Chaetoceros calcitrans*** la cellula con le sete compresse ha una lunghezza di circa 10 $\mu\text{m}$ .

Il suo colore può variare dal marrone-rosso al verde. Nonostante si tratti di una piccola specie di diatomea con cellule piccole e delicate, è facilmente identificabile per la tipica orientazione delle sete, disposte a 45° rispetto all'asse apicale e all'asse perivalvare.

Appartenente al Regno dei Chromalveolata, Phylum dei Heterokontophyta e alla Classe delle Bacillariophyceae. In base alla specie può avere forme diverse, le sue dimensioni variano da 8-12 x 15-17 micron con prolungamenti a mo di corna. Di solito vive come singola cellula ma può formare catene di cellule. Si alleva in acqua salata. Adatta per rotiferi, mitili e gamberi. Ottimi valori nutritivi.

### 3.3.6 Terreno di coltura

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 (Tab.2).

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.

<i>Guillard's F/2 medium</i>			
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.			

Tab.2: Costituenti del terreno di coltura utilizzato

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 (Fig.9).



Fig.9: Pesata terreno di coltura; Autoclave

### 3.3.7 Procedure inoculo colture

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.

### 3.3.8 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.

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. 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 (Fig.10).



Fig.10: Caricamento Camera di Burker e conta al microscopio

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'obiettivo.

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  $0,2 \times 0,05 \text{ mm}$  ( $0,01 \text{ mm}^2$ ) e 9 quadrati (A) aventi lati di 2/40 di mm ovvero di  $0,05 \times 0,05 \text{ mm}$  ( $0,0025 \text{ mm}^2$ ). Lo spessore, dato sempre dal coprioggetto è pari a 0,1 mm per tutti i rettangoli e quadrati (Fig11).

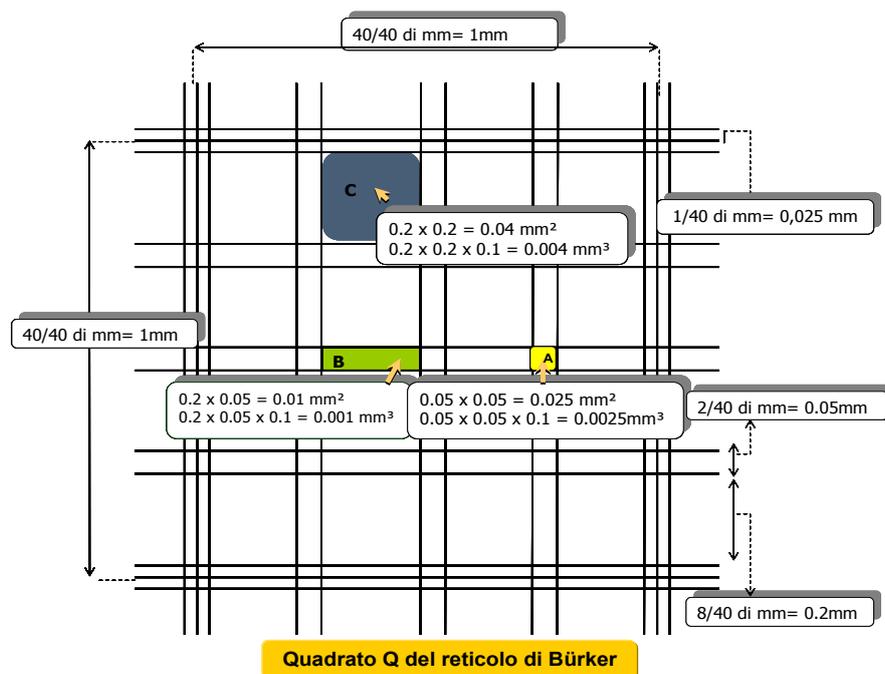


Fig.11: Schema dimensionale di un quadrato della camera di Bürker

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'obiettivo è stato utilizzato un 10x per *Tetraselmis suecica* (che consente di vedere un intero quadrato Q della camera), mentre per *Isochrysis galbana* e *Chaetoceros calcitrans* 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:

Cellule / ml = conteggio medio per quadrato x fattore di diluizione x  $10^4$

### 3.3.9 Modulo di fito-zooplankton colture

Il modulo per la produzione di fito- zooplankton è costituito da:

1. Una scaffalatura in acciaio inox, su cui sono alloggiati 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. Unità di supporto per sacchi in polietilene costituiti da: 28 basi d'appoggio in vetroresina o plastificata con supporto di rinforzo verticale a maglie in ferro plastificato.  
Ciascun sacco è esposto a due lampade al neon fitostimolanti montate verticalmente a fianco al supporto (Fig.12);
3. Zona dedicata alla sterilizzazione chimica dei materiali ed alla manipolazione delle colture.

Le zone sono dotate di lampade a luce fredda a doppia lunghezza d'onda, condotte di aerazione e sistemi di raffreddamento dell'acqua di mare.



Fig.12: Scaffali per colture in piccoli volumi; bustoni per colture in grandi volumi

Le nostre colture algali venivano eseguite in modo scalare a volume crescente, per avere sempre a disposizione piccoli volumi come starter per le nuove colture, e grandi volumi che servono per alimentare i molluschi (Fig13).

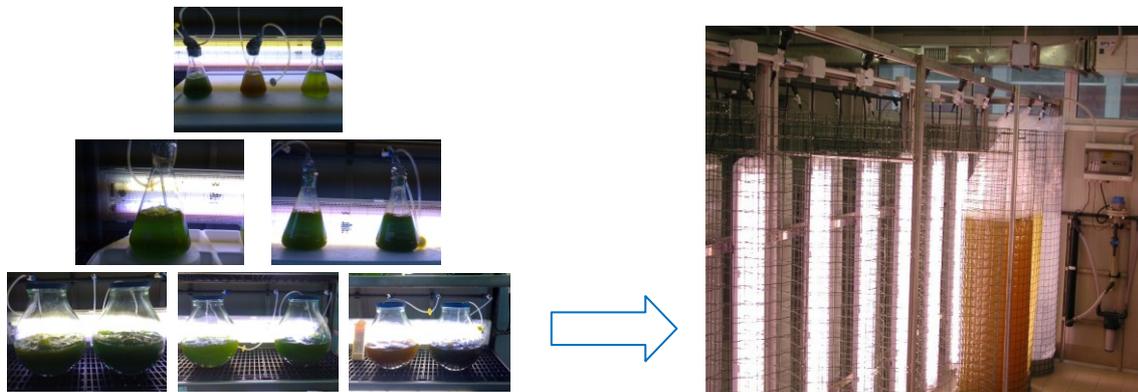


Fig.13: Fitocolture a volume crescente

### 3.3.10 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. 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.

### **3.3.11 Qualità nutrizionali delle microalghe prodotte**

Il valore nutrizionale delle microalghe (*Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana*) è stato valutato mediante il loro contenuto in proteine, carboidrati e acidi grassi polinsaturi.

La preparazione del campione per le diverse analisi è stata effettuata utilizzando le colture algali (accresciute nel terreno di Guillard) nella fase esponenziale finale di crescita (Brown *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1999) anche se in altri studi (Brown e Miller, 1992; Brown e Farmer, 1994) i campioni analizzati erano in fase stazionaria. I campioni sono stati prelevati con cadenza settimanale per entrambe le specie per un periodo di circa 4 mesi.

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

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

### **3.3.12 Determinazione del contenuto proteico**

Il metodo utilizzato per valutare il contenuto proteico delle microalghe è il *Metodo Kjeldahl*, che risulta applicabile a tutti gli alimenti compresi prodotti destinati ad una alimentazione particolare e alle microalghe (G.U., 1994).

#### **Principio e procedimento del metodo di Kjeldahl**

Il metodo prevede l'ossidazione delle sostanze organiche presenti nel campione mediante acidi concentrati in presenza di specifici catalizzatori; il sale di ammonio che si forma nella reazione è trattato con alcali e l'ammoniaca che si libera viene distillata e titolata. Con il termine sostanze azotate totali si intende il contenuto di composti azotati nel campione analizzato. Moltiplicando il contenuto di azoto ottenuto per un fattore convenzionale che varia in base alla matrice alimentare analizzata, si ottiene il contenuto in proteine del prodotto.

E' possibile schematizzare il procedimento utilizzato come segue:

**a. Azoto totale – Digestione** - Introdurre in un pallone due sferette di vetro (regolatori di ebollizione), 0,2 g di ossido di rame, 5 g di campione (pesato con la precisione di 1 mg) e 15 ml di acido solforico al 96% (d = 1,84 a 20°C) mescolando il contenuto.

Scaldare lentamente il pallone Kjendahl nell'apparecchiatura di digestione. Quando la schiuma scompare e si formano abbondanti vapori bianchi, aggiungere 2 g di solfato di potassio e far bollire energicamente fino a quando il contenuto diventi limpido e di colore verde tenue.

La chiarificazione dovrebbe avvenire entro 1 h, mentre per la digestione sono necessarie almeno 2,5 h.

**b. Distillazione** - Al termine della digestione lasciar raffreddare i palloni, aggiungere 50 ml di acqua in ciascuno dei palloni lavandone accuratamente il collo mescolando il contenuto. Aggiungere 70 ml di una soluzione di idrossido di sodio al 50% (m/v) e raccordare all'apparecchiatura per la distillazione in corrente di vapore. Porre all'estremità del tubo di scarico del refrigerante un matraccio contenente 25 ml di acido solforico 0,1 N e 6 gocce di indicatore (indicatore misto: 2 g di rosso di metilene e 1 g di blu di metilene in 1000 ml di metanolo al 96%). Riscaldare portando lentamente ad ebollizione e raccogliendo nel matraccio il distillato fino a quando l'ebollizione diventi irregolare. Disinserire ciascun pallone e lavare l'estremità del tubo di condensa con un po di acqua distillata che verrà raccolta nel pallone.

**c. Titolazione** – Titolare ciascun matraccio tramite buretta con idrossido di sodio 0,1 N fino a viraggio del titolante.

### Espressione dei risultati

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

$$N \text{ totale (g/100g)} = \frac{(25 - A) \cdot 0,1 \cdot 1,4}{m}$$

dove:

25 = millilitri di acido solforico 0,1N

A = millilitri di idrossido di sodio 0,1 N utilizzati

m = grammi di campione sui quali è stata effettuata la titolazione

### 3.3.13 Carboidrati

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

#### **Principio e procedimento del metodo**

Il metodo prevede una digestione enzimatica del campione mediante alfa-amilasi - stabile al calore, proteasi ed aminoglucosidasi (al fine di rimuovere le proteine e l'amido) e una successiva precipitazione con etanolo. Il residuo è poi filtrato ed essiccato. La massa ottenuta, detratte le ceneri e le rimanenti proteine, costituisce la fibra alimentare totale.

E' possibile schematizzare il procedimento utilizzato come segue:

- a. **Digestione enzimatica** – Introdurre il campione – circa 1 g - in un becker da 600 ml, unitamente a 50 ml di tampone fosfato (0,08 M, pH 6,0) e a 100 µl di alfa-amilasi (stabile al calore - da *Bacillus licheniformis*, avente una attività approssimativa di 1.500 unità/ml), miscelando accuratamente. Introdurre i becker, coperti con un foglio di alluminio, in un bagnomaria bollente per 35 minuti dopo il raggiungimento nella sospensione di una temperatura pari a 95-100°C agitando delicatamente ogni 5 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente e portare a pH  $7,5 \pm 0,2$  con una soluzione di idrossido di sodio 0,275 N; aggiungere 0,1 ml della soluzione di proteasi (da *Bacillus licheniformis*, avente una attività approssimativa di 10 unità/mg di solido), miscelare accuratamente ed incubare per 30 minuti in bagnomaria con agitazione continua. Raffreddare fino a temperatura ambiente e portare il pH a 4,0 – 4,6 con una soluzione di acido cloridrico 0,325 N; aggiungere 300 µl di aminoglucosidasi (da *Aspergillus niger*, avente un'attività approssimativa di 3000 unità/ml), miscelare accuratamente, coprire il becker con un foglio di alluminio ed incubare per 30 minuti in bagnomaria a 60°C con agitazione continua.
- b. **Precipitazione e filtrazione** – Preparare i crogioli come segue: porre in ciascun crogiolo 0,5 g di celite (Celite 545 trattata con HCl, lavata ed essiccata, o farina analoga simile), condizionare in muffola alla temperatura di 550°C per 1 h, raffreddare in essiccatore e pesare con una accuratezza di 0,1 mg. Prima di eseguire la filtrazione del campione ridistribuire la celite nel crogiolo usando alcuni millilitri di etanolo al 78% e

mediante aspirazione formare un letto di filtrazione che permetta poi una facile rimozione del materiale.

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

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

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

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

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

### **Espressione dei risultati**

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

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

dove:

**P** = massa delle proteine

**A** = massa delle ceneri

**R<sub>1</sub>** = risultato della prima pesata dell'analisi

**R<sub>2</sub>** = risultato della seconda pesata

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

$$Carboidrati (g/100 g) = \frac{\frac{R_1 + R_2}{2} - P - 4B}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \times 100 \quad (2)$$

dove:

$m_1$  = prima pesata del campione su cui eseguire l'analisi

$m_2$  = seconda pesata del campione su cui eseguire l'analisi

**B** = bianco

### **3.3.14 Determinazione del contenuto in acidi grassi polinsaturi**

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

#### **Princio e procedimento del metodo**

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

E' possibile schematizzare il procedimento come segue:

- a. **Estrazione dei lipidi totali** - Pesati 500 mg di alghe liofilizzate (2 prove per ogni campione) aggiungere 25 ml di una soluzione cloroformio – metanolo – acqua (2:4:1) e omogeneizzare per 30 secondi. Centrifugare per 1 min a 3000 rpm e raccogliere il sovranatante in un imbuto separatore da 500 ml facendolo passare attraverso carta da filtro per evitare eventuali precipitati. Aggiungere 25 ml della soluzione precedente e ripetere tale operazione fino ad arrivare ad un massimo di 350 ml di soluzione aggiunta. Dopo ogni aggiunta omogeneizzare il campione per un minuto e centrifugarlo a 3000 rpm per 1 min. Ogni sovranatante va aggiunto al precedente nell'imbuto separatore. Aggiungere 100 ml di una soluzione cloroformio-acqua (1:1) e recuperare la fase organica.
- b. **Estrazione acidi grassi** - Aggiungere 50 ml di una soluzione di NaCl al 5% e riversare il tutto negli imbuti separatori. Raccogliere la fase organica facendola passare su un filtro contenente sodio solfato anidro (circa 6 cucchiaini) in palloni precedentemente pesati. Risciacquare sempre su filtro con cloroformio puro. Portare a secco mediante rotovapor e pesare i palloni con l'estratto secco.

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

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

### 3.4 Sviluppo di protocolli per l'induzione ed il mantenimento della maturazione sessuale di molluschi bivalvi:

Il modulo della molluschicoltura è costituito da tre vasche in vetroresina da 0,5 m<sup>3</sup> con filtrazione biologica indipendente, concatenate tramite filtro biologico e corredate di lampade UV, filtro meccanico a cartuccia e sistema di refrigerazione dell'acqua (Fig.14).

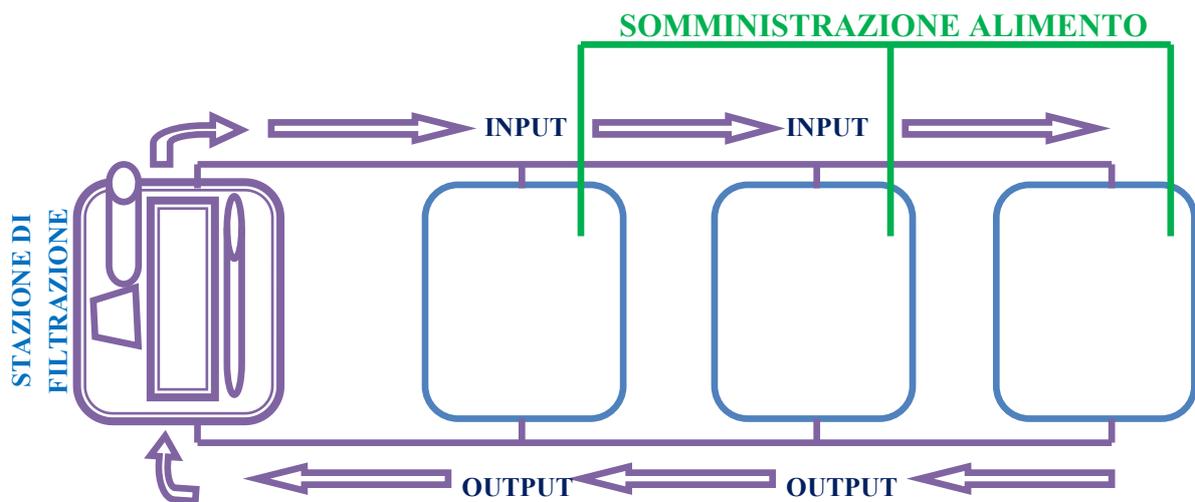


Fig.14: Schema del modulo di allevamento sperimentale per molluschi bivalvi

Le vasche sono fornite di areazione continua, che oltre a mantenere il giusto tenore di ossigeno permette la continua sospensione dell'alimento, che viene somministrato automaticamente da una tubazione che proviene dal modulo di fitocolture.

Il sistema di alimentazione viene programmato in base alle ore di somministrazione ed al flusso di entrata in vasca dell'alimento.

Sono state effettuate delle prove di alimentazione su quattro specie di molluschi bivalvi (*Mitylus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea Edulis* e *Pcten jacobaeus*), utilizzando

miscele di microalghe, per l'induzione della maturazione sessuale o per il mantenimento e la stabulazione di organismi in uno stato di stand-by pre-emissivo di gameti.

### 3.4.1 Esperimenti di induzione della maturazione sessuale: specie *Mytilus galloprovincialis*

Un lotto omogeneo di organismi, prelevati presso allevamenti locali (Fig.15), arrivato al CRIAcq viene sottoposto preliminarmente alle procedure di pulizia degli organismi prima di immergerli nelle vasche. Successivamente vengono selezionati 200 organismi simili per peso (circa 14-20gr) e dimensioni (4,5-6cm) che vengono poi divisi e posti in modo random nelle tre vasche del modulo di allevamento.



Fig.15: Lotto omogeneo di organismi adulti della specie *Mytilus galloprovincialis*

Vengono posizionati in vasca a queste condizioni di allevamento:

- Vasche da 350 lt
- Areazione continua
- Fotoperiodo 14L-10B
- Temperatura  $18 \pm 2$  °C
- Salinità 36 ‰
- Ossigeno disciolto  $7,8 \pm 0,3$  ppm
- pH  $8,2 \pm 0,2$

Gli organismi posizionati in vasca vengono sottoposti ad un periodo di adattamento alle condizioni di allevamento e di azzeramento gonadi (consumo delle risorse energetiche della gonade da parte dell'organismo adulto), mantenendo gli organismi senza alimentazione per circa 10-12 giorni.

Successivamente al periodo di adattamento/azzeramento gonadico sono stati costituiti tre gruppi di 50 organismi posti in vasche diverse ed alimentati con diete differenti per 50 giorni.

Le tre differenti diete sono costituite da miscele di microalghe marine vive delle specie di *Tetraselmis suecica* ed *Isochrysis galbana*:

#### ● **Dieta A:**

- miscela algale di *T. suecica* ed *I. galbana* (rapporto dimensionale 1:4);

- quantità algale, concentrazione in isoequivalenti 1,5 miliardi di cell-die/organismo;
- circa 80 miliardi di cell/die che tradotti in litri equivalgono circa a 9 lt;
- tempo di alimentazione 2 cicli di 6 ore;
- flusso di alimentazione circa 13ml/min – 780ml/ora.

● **Dieta B:**

- miscela algale di *T. suecica* ed *I. galbana* (rapporto dimensionale 1:4);
- quantità algale, concentrazione in isoequivalenti 2 miliardi di cell-die/organismo;
- circa 100 miliardi di cell/die che tradotti in litri equivalgono a circa 11 lt;
- tempo di alimentazione 10 ore;
- flusso di alimentazione circa 18,5ml/min – 1,1lt/ora.

1. **Dieta C:**

- miscela algale *T. suecica* ed *I. galbana* (rapporto dimensionale 1:4), con il 15% della dieta totale di alimento inerte (pasta d'alghe morte concentrata);
- quantità algale, concentrazione in isoequivalenti 3 miliardi di cell-die/organismo;
- circa 150 miliardi di cell/die che tradotti in litri equivalgono a circa 17 lt;
- il 15% del totale cellule, ossia circa 22 miliardi, viene aggiunto alla miscela di alghe vive come pasta d'alghe inerte (concentrazione 7 miliardi cell/ml), quindi con un volume di 4 ml che diluiamo in 4 lt di acqua di mare;
- tempo di alimentazione 14 ore;
- flusso di alimentazione circa 22ml/min – 1,4 lt/ora.

La valutazione dello stato gonadale veniva effettuata mediante periodiche prove di stimolazioni, per mezzo di shock termici ed osmotici, dell'emissione gametica indotta e mediante la conduzione di indagini istologiche.

**3.4.1.1 Stimolazione dell'emissione gametica indotta da parte degli organismi adulti**

La stimolazione dell'emissione avviene tramite shock termico: gli adulti vengono posti insieme in bagni in acqua marina a 35‰ a cicli alternati di 18°C e 28°C ciascuno di 30 minuti e ulteriormente stimolati con l'aggiunta di gameti precedentemente uccisi (tramite congelamento). Nel caso in cui dopo 4 bagni l'emissione non sia ancora avvenuta, è possibile provvedere all'iniezione di KCl 0.5M nel muscolo adduttore posteriore (US EPA 1995; ASTM 2004) oppure effettuare un trattamento chimico con perossido di idrogeno 5 mM in ambiente

basico (pH 9,1) per 15', scartando i bivalvi che emettono durante l'esposizione e utilizzando per i test quelli che emettono in acqua pulita, dopo lavaggio (Turolla *et al.*, 2002; Turolla *et al.*, 2006).



Fig.16: Emissione gametica di adulti di *Mytilus galloprovincialis*. Emissione gametica maschile e femminile

Una volta iniziata l'emissione, gli emettitori vanno immediatamente separati e posti singolarmente in beakers puliti con acqua marina artificiale per l'emissione completa dei gameti. Data la breve durata degli spermatozoi, nel caso in cui i maschi emettano prima delle femmine, è opportuno bloccare l'emissione dei maschi, fino all'ottenimento dei gameti femminili, chiudendo le valve con un grosso elastico e togliendo gli organismi dall'acqua. L'emissione degli spermatozoi deve avvenire con il minimo volume di acqua di diluizione possibile (si consiglia di far in modo che l'acqua ricopra appena le valve), al fine di ottenere una sospensione spermatica concentrata. Le femmine vengono lasciate emettere le uova in un cospicuo volume d'acqua, di circa 150-200 mL per femmina. L'emissione avviene per 30 minuti a 18°C.

### 3.4.1.2 Raccolta, selezione e conservazione dei gameti sperma

#### Spermatozoi

Lo sperma va utilizzato entro 2h dall'emissione e conservato alla temperatura di emissione; vengono selezionati i maschi che producono lo sperma più concentrato e con una buona motilità (la motilità viene controllata al microscopio ottico 200X). Per ottenere un pool spermatico di più organismi, lo sperma di almeno 3 maschi viene unito tramite filtrazione in un cristallizzatore con un setaccio a maglia di 35 µm.

#### Ovociti

Le uova possono essere conservate alla temperatura di emissione per alcune ore. Vengono selezionate le femmine che producono le emissioni più consistenti e con uova di buona qualità.

La sospensione deve contenere uova il più possibile omogenee per forma e dimensioni (controllare al microscopio ottico 10X). Va preventivamente effettuata una breve prova di fecondazione prelevando da ciascuna sospensione 1-2 mL di uova e aggiungendo una piccola quantità di sperma: se le uova non vengono fecondate in breve tempo (comparsa del globulo polare), la sospensione di uova viene scartata. Le sospensioni di uova idonee (almeno 3) vengono unite in un unico pool mediante filtrazione con un setaccio a maglia di 100 µm e raccolte in un cilindro graduato da 500 o 1000 mL. Le uova devono quindi essere tenute in sospensione tramite un apposito agitatore costituito da un manico e da uno stantuffo circolare forato di materiale atossico (possibilmente teflon).

### **3.4.1.3 Fecondazione**

Le uova vengono fecondate inoculando 10 mL di sperma nel cilindro graduato e miscelando delicatamente la sospensione di uova tramite l'apposito agitatore. Per controllare se la quantità di sperma utilizzato è sufficiente, va prelevato un subcampione di uova e verificato al microscopio ottico a 10X che intorno ad ogni cellula uovo siano presenti almeno 10 spermatozoi (His et al., 1997). Altrimenti è possibile procedere con l'aggiunta di ulteriori 5 mL di sperma. Il tempo di fecondazione è di 15 min. Trascorso il tempo di fecondazione, è necessario controllare l'avvenuta fecondazione: osservando al microscopio ottico a 10X un subcampione di uova, più del 90% delle uova devono presentare il globulo polare.

### **3.4.1.4 Esame istologico**

Frammenti di gonade sono stati fissati in formalina al 40%, in seguito i campioni, disidratati nella serie crescente di alcoli (50°,70°,80°,90°,100°,100°), sono inclusi in paraffina e tagliati a 5µM ad un microtomo rotativo (Thermoscientific) e colorati con colorazioni routinaria di Ematossilina e Eosina.

#### **Protocollo di colorazione dei tessuti con Ematossilina & Eosina**

- Sparaffinatura dei campioni : Xilolo I (10'), Xilolo II (10')
- Reidratazione con passaggi in alcool a concentrazione decrescente (alcool assoluto, alcool denaturato, alcool 90° - 70° - 50°)
- Acqua distillata
- Ematossilina (4')
- Risciacquo in acqua distillata
- Acqua di fonte (10')

- Eosina (5')
- Acqua distillata
- Disidratazione con passaggi veloci in alcool a concentrazione crescente(50° - 90° - Alcool assoluto)
- Xilolo I (10')
- Xilolo II (10')
- Montaggio con mezzo acrilico Eukitt

Successivamente l'esame al microscopico dei tessuti è stato effettuato osservando lo stato dell'**ADG** -Tessuto Adipogranulare- tessuto di riserva della gonade; inoltre, si è proceduto all'individuazione dello stato maturativo dei follicoli gonadici attraverso l'individuazione dei **6 stadi** : **Stadio I**- fase di riposo; **Stadio II**- fase iniziale; **Stadio III**- fase avanzata; **Stadio IV**- fase matura; **Stadio V**- fase di rilascio gameti; **Stadio VI**-fase di regressione (Seed, 1975).

### 3.4.2 Esperimenti di induzione della maturazione sessuale: specie *Crassostrea gigas*

Un lotto omogeneo di organismi, provenienti da allevamenti francesi, arrivato al CRIAcq viene sottoposto preliminarmente alle procedure di pulizia degli organismi prima di immergerli nelle vasche (Fig.17).



Fig.17: Organismi adulti di *Crassostrea gigas* durante le operazioni di lavaggio

Successivamente vengono selezionati circa 100 organismi simili per peso (circa 120-160gr) e dimensioni (10-13cm) che vengono poi divisi e posti in modo random nelle vasche del modulo di allevamento.

Vengono posizionati in vasca a queste condizioni di allevamento:

- Vasche da 350 lt
- Areazione continua
- Fotoperiodo 14L-10B
- Temperatura 18±2 °C
- Salinità 36 ‰

- Ossigeno disciolto  $7,8 \pm 0,3$  ppm
- pH  $8,2 \pm 0,2$

Gli organismi posizionati in vasca vengono sottoposti ad un periodo di adattamento alle condizioni di allevamento e di azzeramento gonadi (consumo delle risorse energetiche della gonade da parte dell'organismo adulto), mantenendo gli organismi senza alimentazione per circa 10-12 giorni.

Successivamente al periodo di adattamento/azzeramento gonadico sono stati costituiti due gruppi di 30 organismi posti in vasche diverse ed alimentati con diete differenti per 60 giorni.

Le due differenti diete sono costituite da miscele di microalghe marine vive delle specie di *Tetraselmis suecica* ed *Isochrysis galbana*:

## 2. **Dieta A:**

- miscela algale di *T. suecica* ed *I. galbana* (rapporto dimensionale 1:4);
- quantità algale, concentrazione in isoequivalenti 3 miliardi di cell-die/organismo;
- circa 90 miliardi di cell/die che in litri equivalgono a circa a 10 lt;
- tempo di alimentazione 2 cicli di 6 ore;
- flusso di alimentazione circa 15ml/min – 900ml/ora.

## 3. **Dieta B:** miscela algale di *T. suecica* ed *I. galbana* (rapporto dimensionale 1:4);

- quantità algale, concentrazione in isoequivalenti 5 miliardi di cell-die/organismo;
- circa 150 miliardi di cell/die che in litri equivalgono circa a 17 lt;
- tempo di alimentazione 14 ore;
- flusso di alimentazione circa 20ml/min – 1,2 lt/ora.

La valutazione dello stato di maturazione sessuale è stato eseguito con periodici campionamenti di organismi da cui sono stati biotopicamente prelevati i gameti utilizzati per prove di fecondazione messe a confronto con organismi allevati in mare.

### 3.4.2.1 Ottenimento gameti di *Crassostrea gigas*

I gameti sono stati ottenuti secondo due differenti modalità:

#### 1. **Emissione naturale delle ostriche:**

Le ostriche, poste in un contenitore con acqua di mare ( $34^{\circ}/\text{oo}$ ), sono state stimulate ad emettere con aumenti improvvisi della temperatura dell'acqua. Non appena le ostriche si aprivano per iniziare l'emissione, ciascuna di essa veniva isolata in un singolo contenitore nel quale completava l'emissione dei gameti. Il seme così ottenuto è stato riunito in pools di classi omogenee dopo aver valutato le classi di motilità.

## 2. Prelievo bioptico:

I gameti sono stati prelevati con una pasteur introdotta nella gonade di ciascun ostrica e isolati in differenti contenitori in relazione al sesso e alle valutazioni della qualità: movimento per gli spermatozoi e morfologia per le uova. I gameti, poi sono stati riuniti in sospensioni omogenee (Fig.18).

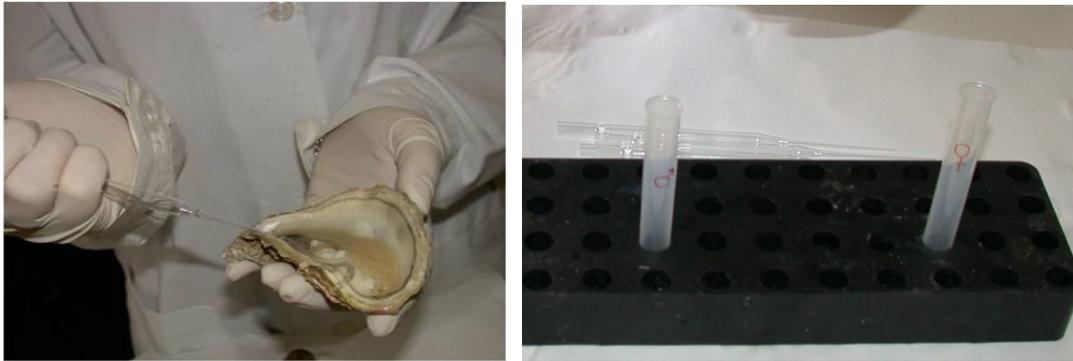


Fig.18: Prelievo bioptico dei gameti; Separazione dei gameti in base al sesso

### 3.4.2.2 Valuzione del tasso di fecondazione

I protocolli di fecondazione utilizzati per le differenti specie analizzate hanno previsto l'aggiunta di piccole quantità di soluzioni di seme attivato in aliquote di sospensioni di ovociti, definendo come rapporto ottimale uova:spermatozoi 1:10, valutato mediante osservazione al microscopio (10X-20X) verificando il numero di spermatozoi presenti attorno ad ogni singola cellula e, in base al risultato ottenuto, provvedendo ad aggiunte di ulteriori aliquote di soluzione spermatica, nel caso in cui il numero fosse minore di 10, oppure a diluizioni con acqua di mare se il numero di spermatozoi risulta essere maggiore di 10, per evitare fenomeni di polispermia (His et al., 1997).

La valutazione del tasso di fecondazione è stata effettuata pochi minuti dopo l'aggiunta degli spermatozoi alla soluzione di ovociti, mediante la verifica del sollevamento della membrana di fecondazione (His et al, 1999). In alternativa la valutazione veniva effettuata verificando la percentuale di emissione del globulo polare 15-20 minuti dall'aggiunta degli spermatozoi.

### 3.4.3 Mantenimento in stand-by di maturazione sessuale di organismi adulti della specie *Ostrea edulis*

Un lotto omogeneo di organismi adulti della specie *Ostrea edulis*, provenienti da allevamenti Bretoni, in uno stato di maturazione sessuale avanzato sono stati stabulati a circuito chiuso per

circa 5 mesi. Vengono selezionati circa 50 organismi simili per peso (circa 80-100gr) e dimensioni (circa 7-8cm) che vengono posti nelle vasche del modulo di allevamento (Fig.19).



Fig.19: Organismo adulto della specie *Ostra edulis*

Le condizioni di allevamento sono state:

- Vasca in vetroresina da 350 lt
- Aerazione continua
- Fotoperiodo 14L-10B
- Temperatura  $16 \pm 2$  °C
- Salinità 36 ‰
- Ossigeno disciolto  $8 \pm 0,3$  ppm
- pH  $8,2 \pm 0,2$

Gli organismi venivano alimentati con una dieta standard, costituita da una miscela algale di *T. suecica* - *I. galbana* – *C. calcitrans* (rapporto dimensionale 1:4:4), quantità algale espressa in isoequivalenti 3 miliardi di cell-die/organismo; tempo di alimentazione 14 ore.

Così è stato possibile mantenere le ostriche in uno stadio di maturità sessuale e di “stand-by” emissivo, il che ha consentito di ottenere spermatozoi dalle gonadi per tutto l’arco di tempo delle sperimentazioni. Gli organismi venivano periodicamente campionati per valutare l’effettivo stadio di maturazione effettuando prelievi biotici di spermatozoi, valutandone la qualità attraverso lo studio dei parametri di motilità.

#### **3.4.3.1 Prelievo gameti**

Gli spermatozoi sono stati ottenuti mediante prelievo biotico mediante una pasteur introdotta nella gonade di ciascun ostrica, isolati in differenti contenitori in relazione alla qualità del movimento degli spermatozoi.

Valutata la qualità del seme ottenuto da ogni ostrica, le sospensioni con caratteristiche simili sono state riunite, costituendo in questo modo vari pools di diversa qualità (Fig.20).

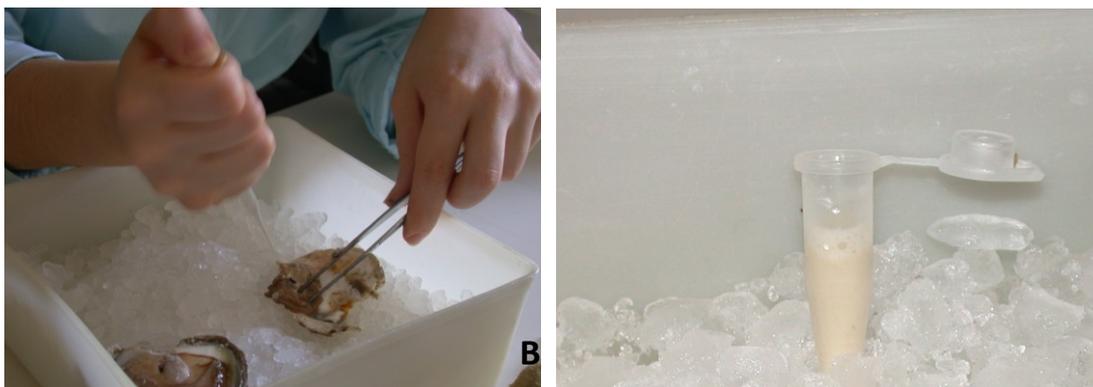


Fig.20: A. Momento del prelievo biotico. B. Pool di seme

### 3.4.3.2 Valutazioni della qualità degli spermatozoi

La valutazione qualitativa degli spermatozoi dei teleostei, molluschi ed echinodermi qui presi in considerazione è stata effettuata analizzando la motilità spermatica, espressa in classi (da 0 a 5), in base alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL), secondo la correlazione proposta da Fabbrocini et al. (2000) e riportata in (Tab.3)

% spermatozoi RVL	0	5	10	15	20	30	50	65	80	90	100
Classe di motilità	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5

Tab.3: Classi di motilità in relazione alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (da Fabbrocini et al., 2000)

L'analisi delle caratteristiche di motilità di queste cellule è stata condotta analizzando differenti parametri della motilità spermatica:

1. *tempo di attivazione*: comportamento del seme nei primi minuti post-attivazione, registrando il raggiungimento della massima classe di motilità;
2. *massima classe di motilità raggiunta*: massima classe di motilità spermatica
3. *durata della massima motilità spermatica*: arco temporale durante il quale il seme mostra una motilità  $\geq$  a classe 3 (arco di classe 3);
4. *durata totale della motilità*: monitoraggio dell'andamento della motilità spermatica dall'attivazione fino alla perdita di motilità (raggiungimento classe 0);
5. *capacità di attivazione nel tempo*: effetto della conservazione in differenti condizioni sperimentali sulla qualità del seme.
- 6.

### 3.4.4 Stabulazione a circuito chiuso di organismi adulti della specie *Pecten jacobaeus*

Organismi provenienti dalle coste dell'Adriatico sono stati stabulati, per la prima volta, a circuito chiuso per circa 1 anno in una vasca circolare in vetroresina con asse centrale da 3,8 m di diametro e 7,5 m<sup>3</sup> di volume operativo, munita di sistema di filtrazione biologica a doppio letto di substrato filtrante (argilla e sabbia corallina), con anelli di tubi corrugati posti sul fondo per il drenaggio dell'acqua filtrata. Due pompe, una sommersa e un'altra esterna, assicurano una adeguata circolazione dell'acqua nel sistema filtrante e la vasca è corredata di una lampada a mercurio per la stimolazione fotoperiodica dei riproduttori (Fig 21).



Fig.21: Organismo adulto di *Pecten jacobaeus*. Vasca di stabulazione organismi

Gli organismi venivano mantenuti ad una temperatura di circa 14°C e venivano alimentati con una dieta standard costituita da una miscela di microalghe vive di *T. suecica* e *I. galbana* (rapporto dimensionale 1:4), quantità algale in isoequivalenti 400 mila cell-die/organismo; tempo di alimentazione 3 cicli di 4 ore.

#### 3.4.4.1 Prelievo e trasporto

Il trasporto degli animali è stato effettuato a secco, in ambiente isolato (camera di polistirolo), mantenuto ad una temperatura di 4-6 °C mediante uso di ghiaccio nel contenitore. Gli animali sono stati trasportati all'interno delle reti con cui erano stati confezionati a Chioggia: il gran numero di animali all'interno della rete fa sì che le due valve restino attaccate e non fuoriesca l'acqua trattenuta all'interno permettendo all'animale di sopravvivere durante il trasporto (Fig.22).



Fig.22: Camera di trasporto e retina di confezionamento

#### 3.4.4.2 Prelievo dei gameti

Gli organismi venivano periodicamente campionati per valutare l'effettivo stadio di maturazione. Gli spermatozoi sono stati ottenuti mediante prelievo bioptico: valutata la qualità del seme ottenuto da ogni pecten, le sospensioni con caratteristiche simili sono state riunite, costituendo in questo modo vari pools di diversa qualità (Fig.23).



Fig.22: Prelievo bioptico costituzione del pool.

#### 3.4.4.3 Valutazione della qualità degli spermatozoi

La valutazione della qualità degli spermatozoi è stata effettuata in ogni fase della sperimentazione controllando la motilità ed i parametri ad essa correlati, come è stato descritto per *O. edulis*.

### 3.5 Sviluppo di protocolli per il mantenimento e l'allevamento di crostacei marini

In questa fase sono stati allestiti allevamenti in piccoli volumi di due specie di crostacei (*Amphibalanus amphitrite* e *Tigriopus fulvus*), sono state testate diverse diete per il

miglioramento delle performance riproduttive, andando a valutare il n° di naupli emessi da ogni organismo adulto.

### 3.5.1 *Amphibalanus amphitrite*

Per la sperimentazione sono stati utilizzati organismi provenienti dall'area portuale di Genova, campionati dalla chiglia delle navi rientrate nei cantieri per la manutenzione ordinaria.

Nella fase di campionamento, per il riconoscimento della specie è stata posta l'attenzione sul numero di placche laterali e sulla presenza delle striature violacee, tipiche della specie *Amphibalanus amphitrite*.

Le fasi di prelievo sono state effettuate con particolare cura in quanto la base di *Amphibalanus amphitrite* risulta essere la parte più delicata dell'organismo. E' molto probabile infatti uccidere gli organismi nel tentativo di prelevarli con forza, poiché anche una piccola perforazione della parte basale non consentirebbe loro un corretto mantenimento delle condizioni vitali all'interno della corazza (Fig.23).



Fig.23: Adulto di *Amphibalanus amphitrite*; porzione basale compromessa

Gli individui campionati sono stati posti a secco in piastre petri, richiusi in un involucro termo isolante e trasportati presso i nostri laboratori.

#### 3.5.1.1 Allevamento

Gli organismi giunti in laboratorio sono stati selezionati, eliminando gli organismi apparentemente danneggiati e quelli morti. Quelli selezionati sono stati portati gradualmente alle condizioni standard di allevamento, in stanza termoregolata alla temperatura costante di  $20\pm 1^\circ\text{C}$  posti nei beaker da 800 ml riempiti precedentemente con acqua di mare preventivamente filtrata a  $0,45\ \mu\text{m}$ , alla salinità al 36‰. Sono state condotte in parallelo due tipologie di allevamento in beaker utilizzando per una l'acqua dle sistema RAS e nell'altra acqua di mare artificiale Istant Ocean.

Gli organismi sono stati posti in piastre petri e quindi nei beaker alla densità di popolazione di 30-40 organismi/beaker.

Questi sono stati sottoposti al fotoperiodo composto da 16:L - 8:B, con un intensità luminosa di 1400 lux e mantenuti in aerazione (Faimali et al., 2004) (Fig.24).



Fig.24: Allevamento in beaker di *Amphibalanus amphitrite*

L'aerazione è stata posta per permettere un giusto mescolamento dell'acqua, poiché *Amphibalanus amphitrite* è un organismo sedentario che usa il cirro per alimentarsi e resta quindi in attesa che le particelle alimentari si trovino al di sopra dell'opercolo. Per eliminare dal mezzo esuvie ed altro materiale di scarto è stato effettuato il cambio totale dell'acqua di allevamento con cadenza trisettimanale e la pulizia degli esemplari.

### 3.5.1.2 Alimentazione

*Amphibalanus amphitrite* è un organismo che si nutre di microalghe e piccoli organismi zooplanctonici. Di conseguenza per il mantenimento degli adulti è stato necessario allestire colture algali del ceppo *Tetraselmis suecica* e provvedere alla periodica schiusa di cisti di *Artemia salina*.

Gli adulti di *Amphibalanus amphitrite* sono stati suddivisi in 2 gruppi e in concomitanza con le operazioni di pulizia sono stati alimentati con diverse concentrazioni della stessa dieta:

- **Gruppo A:** *Tetraselmis suecica*, alla concentrazione finale di  $5 \times 10^5 \text{ cell/ml}^{-1}$ , e nauplii di *Artemia salina*, alla concentrazione finale di 20 larve/ml (Faimali et al, 2004).
- **Gruppo B:** *Tetraselmis suecica*, alla concentrazione finale di  $10 \times 10^5 \text{ cell} \times \text{ml}^{-1}$ , e nauplii di *Artemia salina*, alla concentrazione finale di 40 larve/ml (Fig.25).

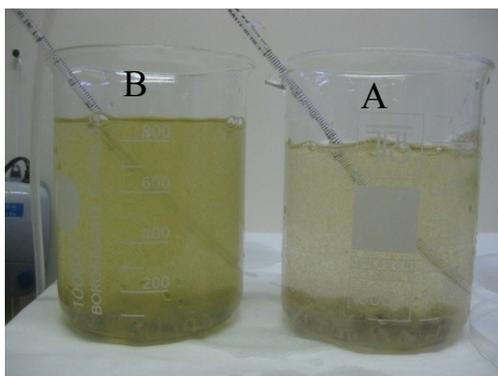


Fig.25: Differenze visive delle differenti diete.

L'effetto della dieta è stato valutato in termini di sopravvivenza degli adulti e di produzione naupliare. Il tasso di sopravvivenza è stato calcolato tenendo in considerazione il n° di adulti morti per settimana.

### 3.5.1.3 Emissione naupliare

Con cadenza periodica di 15 giorni è stata stimolata l'emissione naupliare, inducendo un forte stress agli animali, ponendoli a secco per 45-50 minuti: lo stress è sopportato dagli animali, che chiudono l'opercolo ed intrappolano delle goccioline d'acqua all'interno della corazza, grazie ai cirri. Questo shock favorisce l'emissione naupliare circa dopo un'ora il reinserimento in acqua degli adulti.

La selezione ed il prelievo dei nauplii è stata effettuata sfruttando la loro fototassia positiva: una piccola fonte luminosa laterale al beaker contenente gli adulti è stata posizionata per concentrare le larve in quel punto.

I nauplii concentratisi sono stati prelevati e trasferiti in un beaker con acqua di mare filtrata a  $0,22\mu\text{m}$  e con aerazione ed è stato calcolato il n° di naupli raccolti effettuando delle conte random allo stereo microscopio, su aliquote di 1 ml, in modo da valutare il n° tot di naupli in un beaker.

### 3.5.2 *Tigriopus fulvus*

La popolazione iniziale di *Tigriopus fulvus*, proveniente dalle coste livornesi, è stata fornita dall'ICRAM di Roma, che da anni è impegnato nello studio della fisiologia e del comportamento

ambientale di tale specie. Il trasferimento della popolazione presso la sede dell'attività sperimentale è stato effettuato a temperatura ambiente in bottiglie flaske.

Il mantenimento della coltura di *Tigriopus fulvus* è stato effettuato in acqua di mare filtrata a 0.2 µm al 38 ‰ in flaske da 500 ml (Fig.26). I contenitori sono stati mantenuti in ambiente termostato a 20±2°C con fotoperiodo 16L/8 B. Si è provveduto al ricambio di acqua dei 2/3 del volume totale una volta al mese, effettuato filtrando la coltura con maglia da 120 µm, per evitare la perdita degli animali durante il ricambio d'acqua.

Sono state condotte in parallelo due tipologie di allevamento in flaske sterili da 500ml utilizzando per una l'acqua proveniente dal sistema di ricircuitazione e nell'altra acqua di mare artificiale Istant Ocean. Si è provveduto al ricambio di acqua mensilmente di circa 2/3 del volume totale.



Fig.26: A femmina; B maschio; C nauplio; Allevamento in flaske di *Tigriopus fulvus*

### 3.5.2.1 Selezione di copepoditi per ottenimento di femmine ovigere sincronizzate

Per l'allestimento del test è necessario avere femmine ovigere giovani e sincronizzate. Infatti precedenti test preliminari effettuati su femmine provenienti direttamente dalla coltura madre, hanno mostrato mortalità del 20% di esse durante il test, indipendentemente dalla dieta testata.

Per ovviare a tale inconveniente si è provveduti alla selezione di 200 copepoditi tra il IV e il V stadio provenienti dalla coltura mantenuta in laboratorio .

Per ovviare a tale inconveniente si è provveduti alla selezione di 200 copepoditi tra il IV e il V stadio provenienti dalla coltura mantenuta in laboratorio .

La selezione è stata effettuata prelevando di aliquote random dalla coltura, con pipetta pasteur ; queste poste in disco petri sono state esaminate allo stereomicroscopio.

L'elevato numero di copepoditi selezionati è dovuto al fatto che non si è certi a che stadio essi siano e del loro sesso ed inoltre tale numero garantisce la necessaria casualità nella formazione di coppie.

I copepoditi di *T. fulvus* selezionati sono stati posti in un becker alle stesse condizioni di allevamento. Successivamente si è attesa la formazione di almeno 50 coppie in copula,

prelevate con un puntale Gilson attaccato ad un tubicino di gomma. Le coppie sono state poste in un beacker alle medesime condizioni di allevamento.

### 3.5.2.2 Selezione femmine ovigere

Al termine della fase copulativa si è versato tutto il contenuto del becker su microsetaccio da 90  $\mu\text{m}$  con maglia di 80-90  $\mu\text{m}$ , da qui le femmine ovigere ottenute sono state raccolte con un puntale Gilson (Fig.27).



Fig.27: prelievo e selezione femmine ovigere

Ciascuna femmina è stata posta in 30 ml di acqua di mare filtrata a 0.2  $\mu\text{m}$  al 38 ‰ in disco petri e lasciata a digiuno per 24 h al fine di prepararle alla somministrazione delle differenti diete algali. Su ciascun disco petri è stata preventivamente disegnata una griglia sulla base per facilitare la conta dei naupli.

### 3.5.2.3 Allestimento TEST di alimentazione

Gli animali lasciati a digiuno per 24 h sono stati isolati in una piccola goccia. Si è provveduto alla raccolta dei naupli rilasciati dalle femmine non alimentate, posti nei beaker della coltura di allevamento. Prima dell'allestimento del test è stata osservata allo stereo microscopio la mobilità delle femmine isolate come indice di benessere.

Le femmine sono state poste in piastre petri contenenti l'opportuno volume di acqua di mare filtrata a 0.2  $\mu\text{m}$  al 38 ‰ con l'aggiunta della specifica dieta da testare (Fig.28).

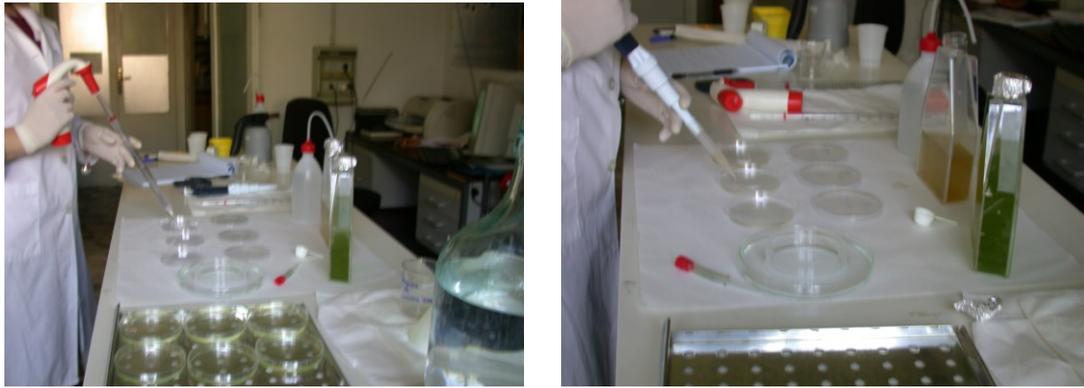


Fig.28: Allestimento esperimento di alimentazione

L'alimentazione è stata effettuata settimanalmente con mangime TetraMarine® e mix algale di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis galbana* .

#### Diete somministrate

Dieta A Standard	Miscela di alghe vive dei ceppi <i>Isochrysis galbana</i> + <i>Tetraselmis suecica</i> $1,5 \times 10^5 + 3 \times 10^5$ cell/ml;
Dieta B	Miscela di alghe vive dei ceppi <i>Isochrysis galbana</i> + <i>Tetraselmis suecica</i> $3 \times 10^5 + 6 \times 10^5$ cell/ml;
Dieta C	Tetramarin flakes (mangime liofilizzato per pesci tropicali) 3,5gr/100ml;
Dieta D	Soluzione algale monoceppo di <i>Isochrysis galbana</i> $6 \times 10^5$ cell/ml
Dieta E	Soluzione algale monoceppo di <i>Tetraselmis suecica</i> $3 \times 10^5$ cell/ml

#### 3.5.2.4 Valutazione della produzione naupliare

Per la valutazione della produzione naupliare al termine della settimana si è provveduto all'isolamento della femmina contenuta nella piastrina con puntale Gilson , la gocciolina di acqua contenente la femmina è stata posta da parte e si è controllato se in essa vi fosse qualche nauplio . Le piastre private della femmina sono state fissate con 500 µl di formalina al 4 % e si è provveduti alla conta dei naupli con stereomicroscopio annotandone il numero.

### **3.6 Validazione dei protocolli gestionali e produttivi mediante valutazione della qualità dei gameti, embrioni e giovanili degli organismi allevati a circuito chiuso:**

Vengono messi a confronto tutti i gameti gli embrioni e gli organismi giovanili prodotti in RAS con organismi presi in natura per valutare l'effettiva qualità degli allevamenti condotti a circuito chiuso che hanno utilizzato la stessa acqua (opportunamente trattata) per tutto il periodo di sperimentazione.

Per le specie allevate sono stati condotti delle valutazioni differenti:

- Il test per le specie *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* è stato un confronto di normale sviluppo a larva D degli embrioni generati con gameti dei diversi lotti di animali;
- Per *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus* è stato condotto un confronto di qualità sulla motilità spermatica dei diversi gruppi di organismi;
- Per le due specie di crostacei allevati *Amphibalanus amphitrite* e *Tigriopus fulvus* sono stati allestiti dei saggi di sopravvivenza naupliare una acqua artificiale standard ASTM.

#### **3.6.1 Test di sviluppo a larva D di molluschi bivalvi**

A seguito dell'aggiunta di seme alla soluzione di ovociti si è proceduto alla stima della densità delle uova e del numero di spermatozoi per ogni uova.

Successivamente è stato definito il volume V (in  $\mu\text{L}$ ) da prelevare dalla sospensione di uova fecondate tale da inoculare 200 uova fecondate in ciascuna camera test (3 mL).

L'allestimento delle camere test è stato effettuato immettendo 3 ml di acqua di mare artificiale ASTM per ogni pozzetto della piastra multiwells ed aggiungendo il volume V di sospensione di uova calcolato. Per ottenere la medesima concentrazione di uova in ogni pozzetto della piastra la soluzione di uova fecondate è stata mantenuta in continua agitazione durante le operazioni di prelievo del volume di sospensione calcolato.

Gli embrioni sono stati inoculati al buio alla temperatura costante di 18°C per 48h.

##### **3.6.1.1 Termine del test**

aggiunta nella soluzione test di 10  $\mu\text{L}$  di formalina, dove per formalina si intende formaldeide (che commercialmente si trova al 37-40%) diluita con acqua deionizzata fino al 4% e tamponata con sali (generalmente tetraborato di sodio) fino a pH=7.

### 3.6.1.2 Conteggi

il numero totale di organismi che deve essere contato per ogni camera test è pari a 100. Gli organismi vanno distinti tra larve normoformate e anomalie (Fig.29).

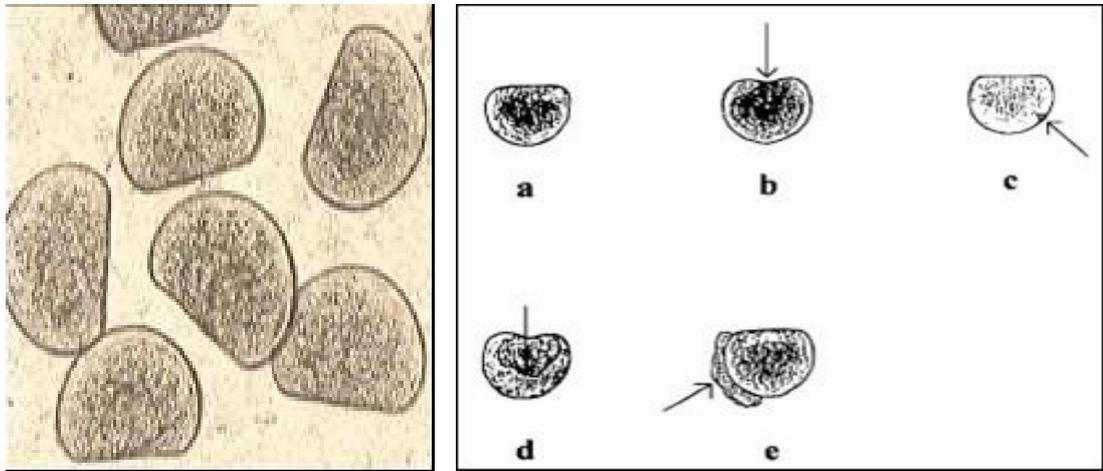


Fig.29:Larve D normoformate; esempi di larva normoformata (a) e delle malformazioni larvali: larva con convessità del cardine (b), margine della conchiglia danneggiato (c), conchiglia incompleta (d) e mantello estruso (e) (da His et al., 1997).

Le anomalie sono costituite da:

- stadi prelarvali, cioè tutti quegli stadi che vanno dalle prime divisioni cellulari fino allo stadio di trocofora (alcuni esempi sono riportati in Fig.30a);
- larve morte, cioè tutte quegli organismi di cui si riscontra solo la conchiglia, ma non vi è traccia di parti molli (un esempio in Fig.30b);
- malformazioni vere e proprie, che comprendono la presenza di larva convessa, oppure di margine della conchiglia danneggiato, oppure di conchiglia incompleta oppure di mantello estruso (dettagli in figura 4).



Fig.30: a esempi di stadi prelarvali (due trocofore); b esempio di larve morta

### 3.6.1.3 Endpoint

Numero di larve normoformate, anomale e non sviluppate

### 3.6.1.4 Accettabilità del test

Il test è da considerarsi valido se la percentuale di larve normoformate nel controllo negativo (soluzione test con soltanto acqua di diluizione) è  $\geq 70\%$ .

A seguito dell'incubazione degli embrioni alle più opportune condizioni, riportate in Tabella q, le larve sono state fissate mediante aggiunta di formalina al 40% e campioni random di 100 larve sono stati osservati al microscopio per registrare la presenza di stadi larvali normoformati, in base a simmetria, forma, dimensione.

### 3.6.2 Valutazioni della qualità degli spermatozoi di molluschi bivalvi

La valutazione qualitativa degli spermatozoi dei molluschi qui presi in considerazione è stata effettuata analizzando la motilità spermatica, espressa in classi (da 0 a 5), in base alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (RVL), secondo la correlazione proposta da Fabbrocini et al. (2000) e riportata in (Tab.4)

% spermatozoi RVL	0	5	10	15	20	30	50	65	80	90	100
Classe di motilità	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5

Tabella - Classi di motilità in relazione alla percentuale di spermatozoi con movimento rapido, vigoroso e lineare (da Fabbrocini et al., 2000)

L'analisi delle caratteristiche di motilità di queste cellule è stata condotta analizzando differenti parametri della motilità spermatica:

1. *tempo di attivazione*: comportamento del seme nei primi minuti post-attivazione, registrando il raggiungimento della massima classe di motilità;
2. *massima classe di motilità raggiunta*: massima classe di motilità spermatica
3. *durata della massima motilità spermatica*: arco temporale durante il quale il seme mostra una motilità  $\geq$  a classe 3 (arco di classe 3);
4. *durata totale della motilità*: monitoraggio dell'andamento della motilità spermatica dall'attivazione fino alla perdita di motilità (raggiungimento classe 0);
5. *capacità di attivazione nel tempo*: effetto della conservazione in differenti condizioni sperimentali sulla qualità del seme.

### 3.6.3 Test di sopravvivenza naupliare dei crostacei utilizzati

I nauplii raccolti a seguito dell'emissione sono stati sottoposti ad una serie di lavaggi con acqua di mare per eliminare eventuali corpi estranei ed in seguito risospesi e diluiti alla densità di circa 10 naupli/ml. La valutazione della densità è stata effettuata mediante ripetute conte di aliquote della soluzione mantenuta in aerazione.

La valutazione della sopravvivenza è stata effettuata mediante l'utilizzo di piastre multi pozzetto (multiwell 12pz) , inserendo in ogni pozzetti 2 ml della soluzione di naupli (circa 20 animali /pozzetto).

Al termine del periodo di incubazione in acqua artificiale standard ASTM, di 48h, è stata effettuata la stima della sopravvivenza determinando allo stereo microscopio il n° dei morti, ovvero gli esemplari che, osservati per 10 secondi, non mostravano alcun tipo di movimento delle appendici (Fig.31).

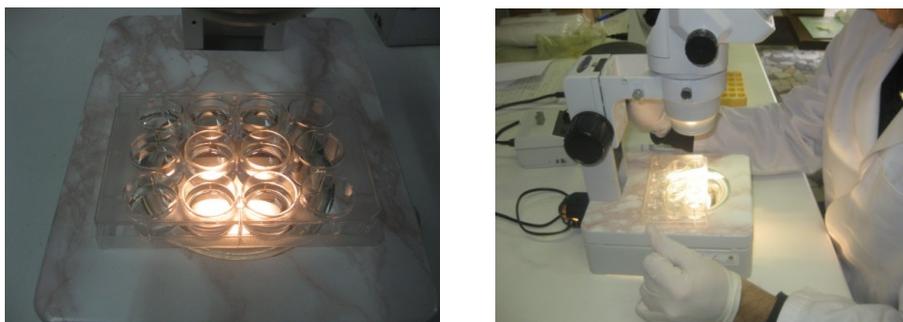


Fig.31: allestimento e valutazione del test

Al fine di ottenere la percentuale di sopravvivenza effettiva, al termine delle 48h gli organismi sono stati fissati con formalina al 37% in modo da effettuare la conta totale dei naupli.

### 3.7 Analisi statistica

Ogni esperimento, effettuato in triplicato, è stato ripetuto almeno tre volte ( $n \geq 9$ ).

L'analisi statistica è stata condotta effettuando l'ANOVA ad una e due vie, in relazione alla tipologia dei dati da analizzare, per il calcolo dei primi effetti significativi rispetto al controllo. Un test t di Student del campione accoppiato è stato utilizzato per analizzare le differenze significative tra due gruppi campione.

Un valore di  $p < 0,05$  è stato scelto come livello per la significatività.

Capitolo 4  
Analisi dei Risultati  
e  
Discussioni

#### 4.1 Ottimizzazione della gestione delle acque nel sistema a ricircolazione idrica:

Lo scopo perseguito durante lo svolgimento delle sperimentazioni della prima fase sperimentale è stato quello di verificare l' idoneità dei materiali utilizzati, di monitorare la qualità delle acque lungo il percorso di depurazione e di individuare la giusta sequenza dei trattamenti dei lotti d'acqua necessari per le sperimentazioni. L'acqua utilizzata per la conduzione delle sperimentazioni è stata prelevata nel Golfo di Salerno.

##### 4.1.1 Valutazione della qualità dei materiali utilizzati

Preliminarmente alle sperimentazioni è stata valutata la qualità dei materiali, in particolare per valutare l'eventuale tossicità delle vernici delle vasche, esponendo gameti di (ricci di mare) *Paracentrotus lividus* alle acque stoccate nelle differenti vasche di trattamento e ne è stato valutato lo sviluppo 60h post fecondazione (Fig.32).

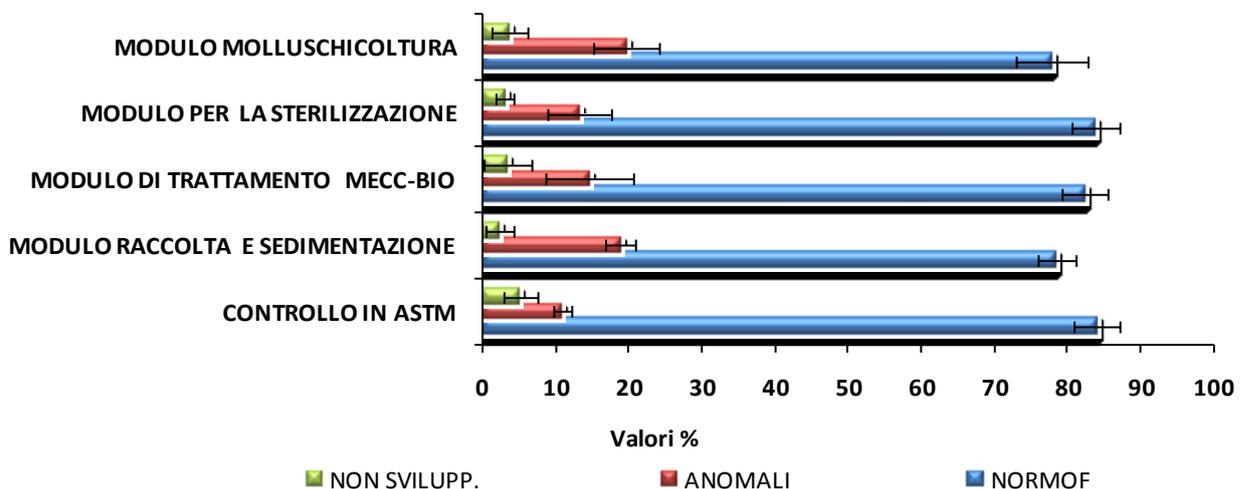


Fig.32: Valutazione qualità delle acque nelle differenti vasche mediante valutazione media percentuale di sviluppo dei *Paracentrotus lividus*.

Dal grafico non si evincono differenze significative dal controllo, quindi escluso l'effetto tossico delle vernici si è proceduto con le indagini chimiche e microbiologiche per la valutazione dell'efficienza dei trattamenti.

##### 4.1.2 Andamento dei parametri microbiologici e chimico-fisici

Le indagini microbiologiche mostrano un abbattimento totale della carica batterica totale al termine del percorso di trattamenti (Fig.33).

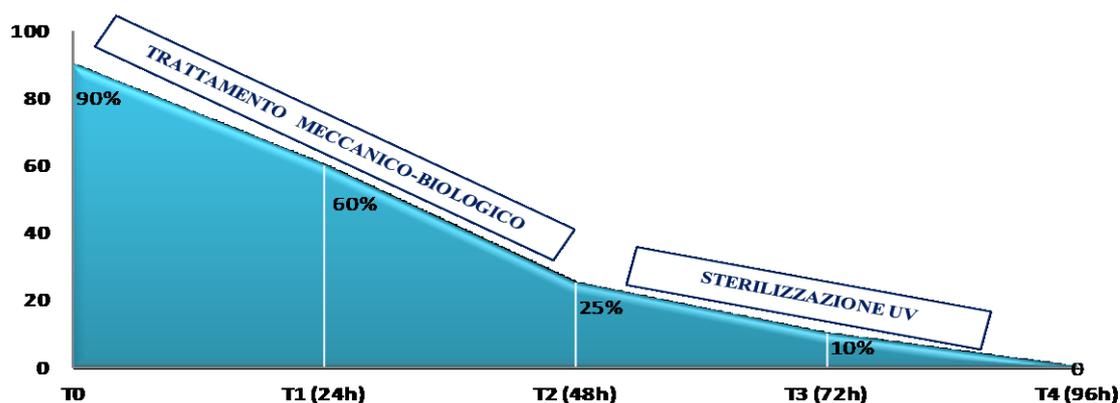


Fig.33: Abbattimento della carica microbica lungo il percorso di trattamenti.

In tale fase è stata accertata anche l'efficienza dell'aggiunta di 20 l di scarto di produzione della microalga *Isochrysis galbana* (concentrazione di  $7 \cdot 10^6$  cell/ml) per migliorare l'efficienza del modulo di trattamento biologico per l'abbattimento dei nitrati.

L'inoculo algale venne eseguito per migliorare l'efficienza del modulo di trattamento biologico per l'abbattimento dei nitrati stessi (Fig.34).

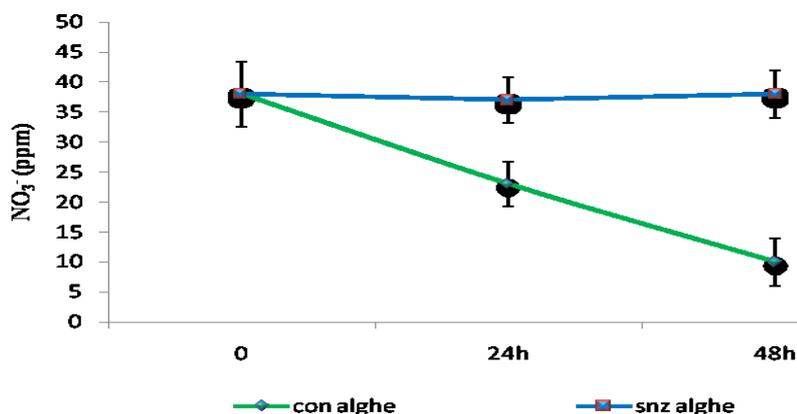


Fig. 34: Andamento dei contenuti di nitrati nel modulo di trattamento mecc-biol mediante aggiunta di microalghe.

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 24 ore di trattamento e 10 ppm in 48 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 ore.

### 4.1.3 Individuazione delle fasi e dei tempi di trattamento

Verificata l'ideoneità dei materiali ed avendo un quadro globale della qualità delle acque, lungo il percorso dei trattamenti, grazie alle continue analisi microbiologiche e chimiche, siamo riusciti ad individuare la giusta sequenza di trattamenti ed i tempi di permanenza dei lotti d'acqua, necessari per le sperimentazioni, da trattare nelle diverse vasche di trattamento (Fig.35):

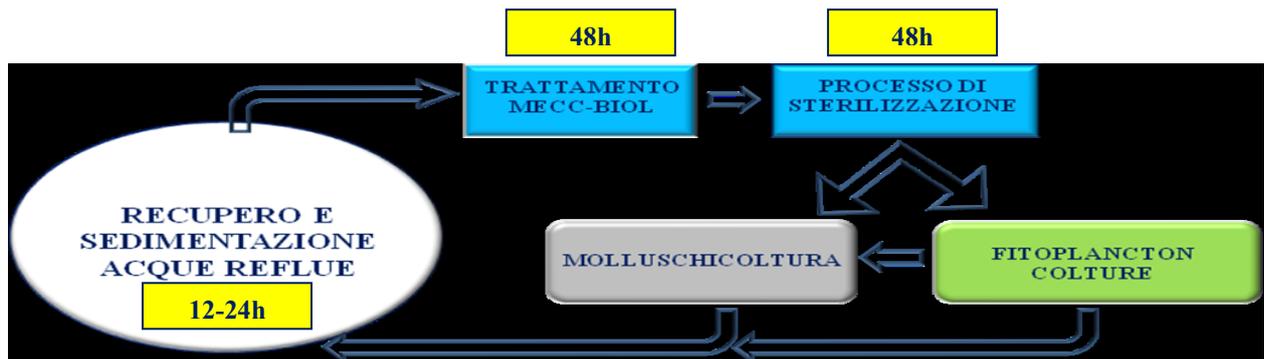


Fig.35: Sequenza e tempi di trattamento delle acque ricicchanti

### 4.1.4 Controllo della qualità delle acque nel tempo

Periodicamente venivano effettuati dei saggi di tossicità sulle acque del sistema, lungo il percorso di trattamenti, per valutare l'effettiva salubrità delle acque (Fig.36).

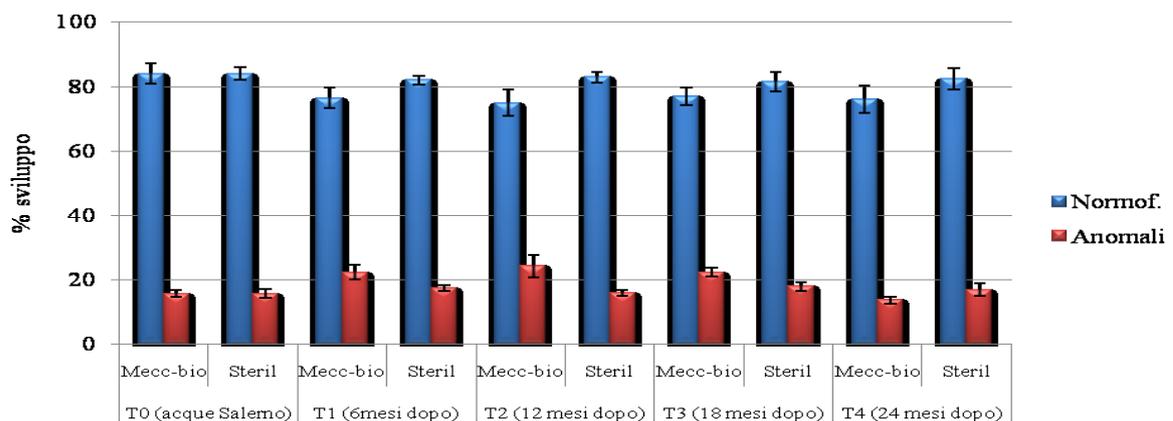


Fig.36: Effetti delle acque del sistema sullo sviluppo a larve/plutei di *Paracentrotus lividus* durante tutta la sperimentazione (24 mesi). Valori medi percentuali.

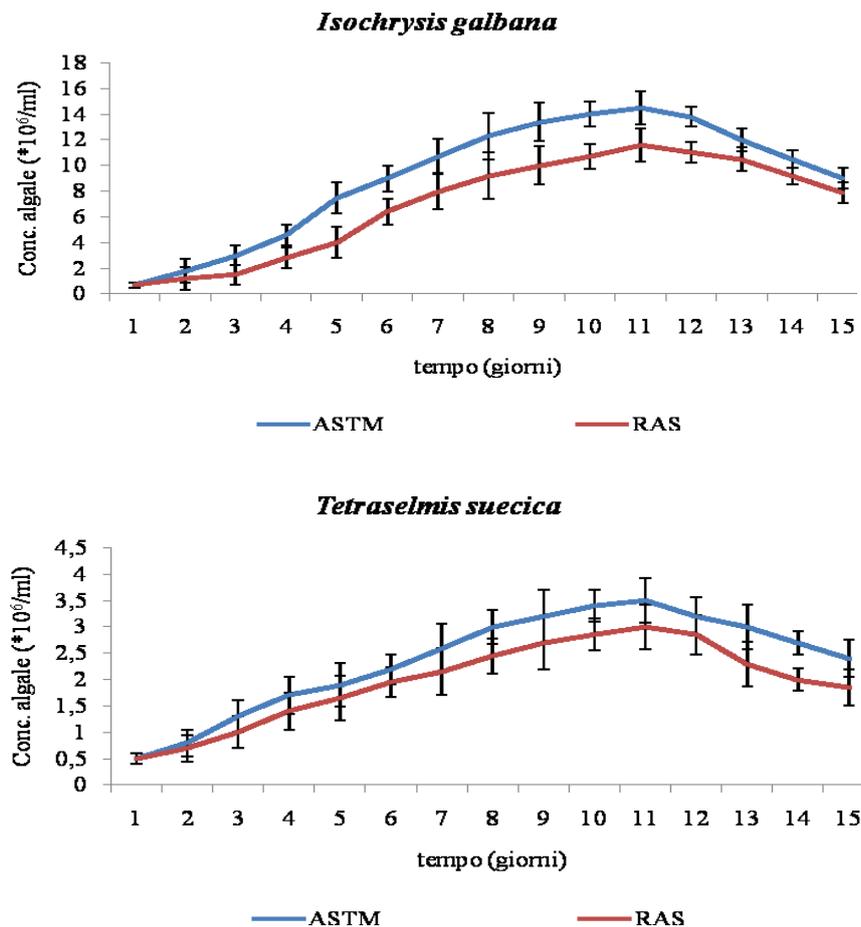
La qualità dell'acqua si è mantenuta costante lungo tutto l'arco delle sperimentazioni, dato confermato dalle percentuali di sviluppo eseguite in tempi diversi.

## 4.2 Risoluzioni delle problematiche legate alla produzione massiva di fitocolture in sistema a circuito chiuso:

Le colture di microalghe sono state condotte per tutto l'arco delle sperimentazioni utilizzando sempre acqua proveniente dal nostro modulo di allevamento molluschi, opportunamente depurata (come sopra) e sterilizzata.

### 4.2.1 Curve di crescita in piccoli volumi dei tre ceppi di microalghe utilizzati

Le colture fitoplanctoniche sono state ottimizzate successivamente all'ottimizzazione dei trattamenti delle acque. L'acqua utilizzata per le colture di microalghe dopo il percorso dei trattamenti veniva filtrata con un filtro meccanico a cartuccia della porosità di  $1\mu\text{m}$ , i tre ceppi utilizzati nelle sperimentazioni presentano andamenti di crescita nel tempo differenti (Fig.37):



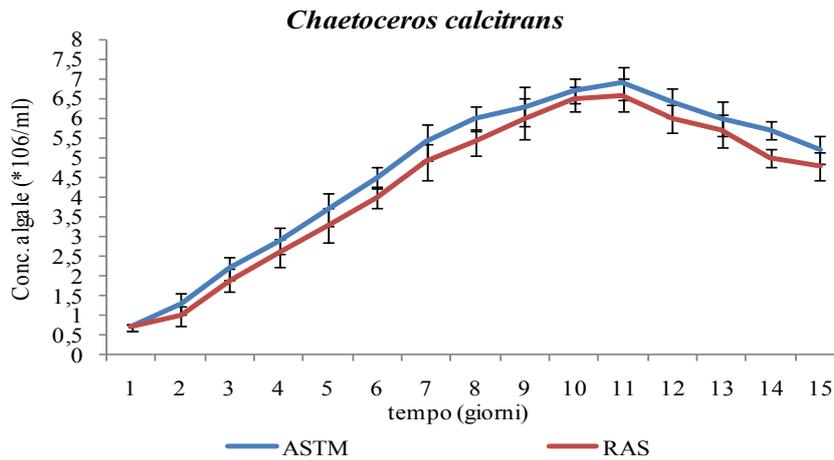


Fig.37: Andamenti delle colture algali nel tempo dei tre ceppi utilizzati: *Isochrysis galbana*; *Tetraselmis suecica* e *Chaetoceros calcitrans*.

Le curve mostrano i diversi andamenti di crescita nel tempo, di colture effettuate in piccoli volumi (500-1000 ml) dei tre ceppi utilizzati.

#### 4.2.2 Confronto curva di crescita in grandi volumi del ceppo algale *Isochrysis galbana*

Lungo la sperimentazione, per le colture di microalghe in grandi volumi, è stato utilizzato un prototipo artigianale sperimentale di fotobioreattore per velocizzare la crescita di *Isochrysis galbana*. Nel grafico viene messa a confronto la curva di crescita in sacchi da 150l con quella del fotobioreattore avente stessa capacità (Fig.38).

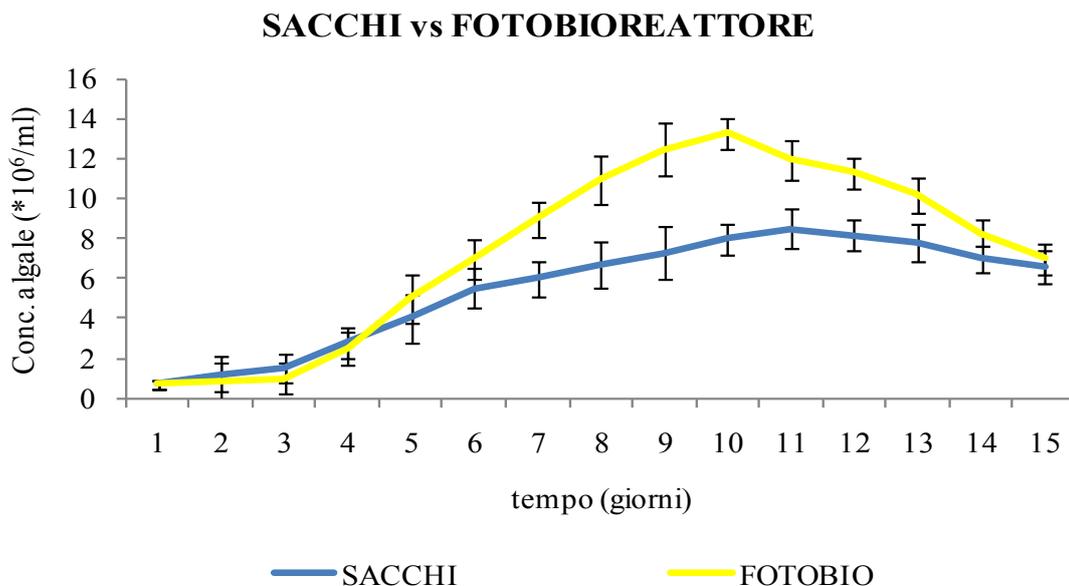


Fig.38: Confronto curve di crescita algale di *Isochrysis galbana* in colture effettuate in grandi volumi

Dal grafico si evidenzia che le colture di microalghe effettuate nel prototipo sperimentale di fotobioreattore hanno mostrato un andamento della crescita nel tempo più veloce delle colture effettuate nei classici sacchi per fitocolture (di plastica trasparente).

Inoltre il fotobioreattore non solo permette di ottenere buone concentrazioni algali con due giorni di anticipo ma anche in termini di concentrazione cellulare/ml si ha un aumento di circa il 20% rispetto alle colture classiche.

#### 4.2.3 Medie dei parametri di crescita e dei valori nutrizionali delle microalghe lungo tutta la sperimentazione

Le performance di crescita, dei due ceppi utilizzati per tutta la sperimentazione, *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica*, non hanno mostrato né ritardi per quanto riguarda il raggiungimento della massima concentrazione raggiunta né cali per quanto riguarda le concentrazioni (Fig.39).

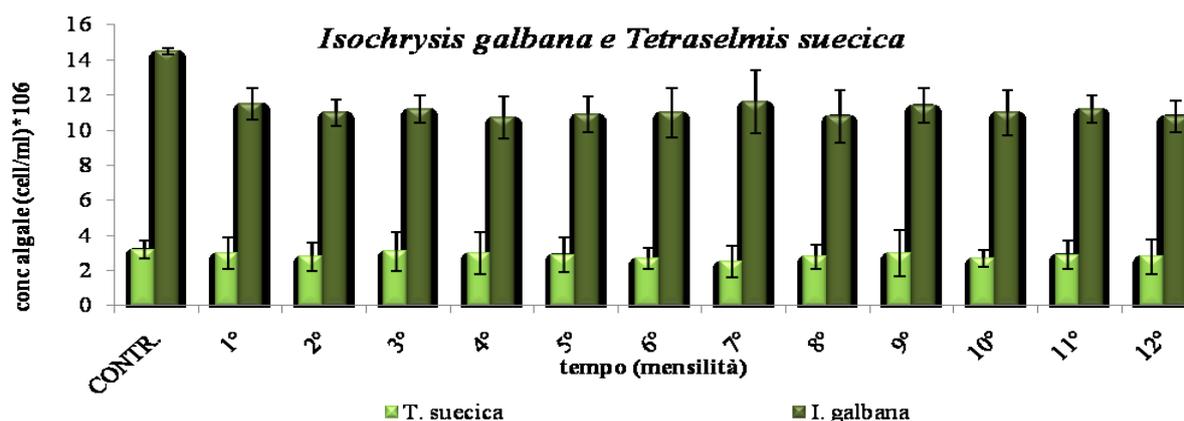


Fig.39: Valori medi mensili dei picchi massimi di crescita dei ceppi *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* per tutto il periodo di produzione algale.

Allo stesso modo le microalghe hanno mantenuto per tutto il periodo della sperimentazione lo stesso contenuto nutrizionale senza mostrare decrementi di nessuno dei costituenti (Tab.4).

	Carboidrati	Proteine	Lipidi tot
T. Suecica	20,30±4,2	41,45±3,5	18,20±3,4
I. galbana	26,75±1,6	36,84±3,1	20±2,1
C. calcitrans	23,45±5,2	24,5±2,3	13,65±3,2

Tab.4: Valori medi percentuali dei contenuti nutrizionali dei ceppi di microalghe utilizzati nella sperimentazione.

#### 4.2.4 Necessità produttive e produzioni reali

Per le necessità sperimentali è stato necessario produrre circa 500 miliardi di cellule algali al giorno corrispondenti a circa 50 l di colture dei diversi ceppi utilizzati al giorno.

Le effettive produzioni messe in coltura in modo sfalsato, per garantire la raccolta quotidiana delle microalghe, si sono rivelate superiori alle necessità sperimentali, tali da sopperire a riduzioni accidentali di produttività (esempio: colture inquinate o rottura sacchi) (Tab.5).

RESOCONTO GIORNALIERO DELLE PRODUZIONI ALGALI		
	Litri	cell/die
Produz. classica (in sacchi)	100 (50 <i>T.s.</i> +50 <i>I.g.</i> )	(125 <i>T.s.</i> + 550 <i>I.g.</i> ) x10 <sup>9</sup> = 1050 x10 <sup>9</sup> Iso-equiv.
Produz. sperim. (fotobioreattore)	75 ( <i>I.galbana</i> )	975x10 <sup>9</sup>
Totale capacità produttiva	175	2025 x10 <sup>9</sup> Iso-equiv.
Necessità quotidiane	~50	500x10 <sup>9</sup>

Tab.3: Resoconto delle necessità produttive giornaliere e delle reali produzioni fitoplanctoniche

#### 4.3 Sviluppo di protocolli per l'induzione ed il mantenimento della maturazione sessuale di molluschi bivalvi:

I risultati si riferiscono a prove di induzione alla maturazione sessuale di *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas* e prove di stabulazione e mantenimento in stand-by di maturazione sessuale delle specie *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus*.



##### 4.3.1 Prove di maturazione sessuale a circuito chiuso di *Mytilus galloprovincialis*

Le diete sperimentate ed i flussi, di caduta dell'alimento in vasca, adoperati ci hanno condotto, anche grazie alle indagini istologiche ed alle accurate valutazioni di qualità dei gameti prodotti, ad individuare la giusta dieta per indurre la maturazione sessuale ad organismi adulti di *Mytilus galloprovincialis*. La dieta più efficace si è rivelata la dieta C che oltre ad avere la più elevata concentrazione di microalghe conteneva il 15% di alimento inerte (pasta di alghe super concentrata 10<sup>9</sup> Iso-equiv/ml), aggiunto alla miscela di microalghe vive somministrate.

Al termine dell'esperimento di alimentazione tutti gli organismi impiegati, per le tre diverse diete sperimentali, sono stati sottoposti a degli shock termici per l'induzione all'evento indotto di emissione dei gameti. Come controllo è stato utilizzato un lotto omogeneo di organismi prelevati da habitat naturali costituito dallo stesso numero di organismi dei lotti sperimentali (Fig.40).

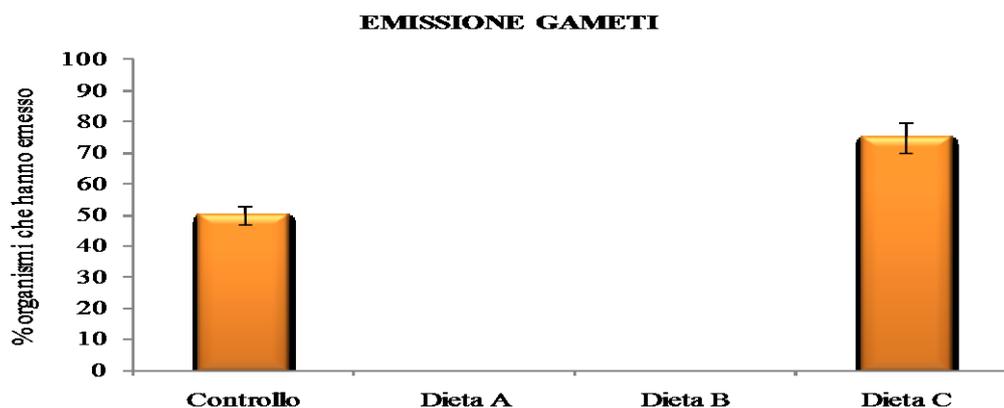


Fig.40: Percentuali di organismi che hanno rilasciato gameti successivamente a shock termico

Dal grafico si evidenzia che l'unico gruppo di organismi capaci di emettere spontaneamente gameti è stato quello sottoposto alla Dieta C. Inoltre questo gruppo è sembrato essere ad uno stadio di maturazione sessuale ottimale, rispetto agli organismi presi in natura poiché il numero di organismi adulti che hanno rilasciato gameti è stato maggiore.

Successivamente la nostra attenzione è stata rivolta in particolar modo al lotto di organismi che hanno dimostrato la capacità di rilasciare gameti (quelli della Dieta C).

Per quanto riguarda le indagini istologiche la classificazione degli stadi di maturazione gonadale è stata attribuita secondo Seed et al, 1975 (Tab.6).

<b>DIETA A</b>	<b>80% Stadio II (Seed 1975) (gametogenesi precoce)</b> <b>20% Stadio III (gametogenesi avanzata)</b>
<b>DIETA B</b>	<b>60% Stadio II (gametogenesi precoce)</b> <b>30% Stadio III (gametogenesi avanzata)</b> <b>10% Stadio IV (gonade piena/matura)</b>
<b>DIETA C</b>	<b>20% Stadio IV (gonade piena/matura)</b> <b>80% Stadio V (gonade pronta a rilasciare i gameti)</b>

Tab.6: Attribuzione stadio di maturazione sessuale secondo Seed et al, 1975.

Gli organismi sottoposti alla Dieta C oltre ad essere stati gli unici capaci di rilasciare gameti mediante emissione indotta, morfologicamente la gonade dimostra di essere in uno stadio di maturazione avanzato (Fig.41)

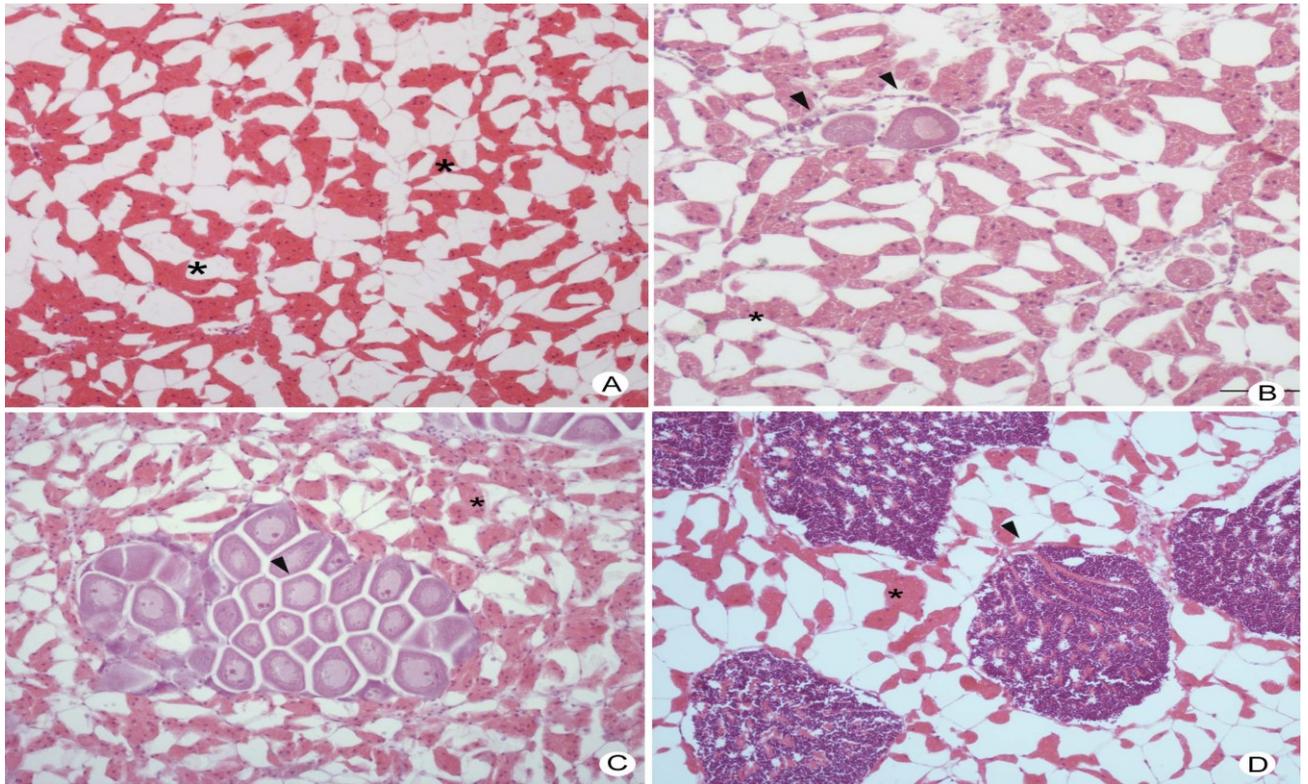


Fig.41 : A. e B. tessuto gonadale di organismi all'inizio della sperimentazione alimentare; C e D tessuto gonadale femminile e maschile degli organismi sottoposti a Dieta C al termine dei 50 giorni di alimentazione.

In tabella vengono illustrate le foto di tessuti gonadali degli organismi adulti di *Mytilus galloprovincialis* al tempo zero (A e B) e quelli sottoposti a Dieta C al termine della somministrazione (C gonade femmine; D gonade maschili).

La foto A mostra un mantello privo di gameti e presenza del solo tessuto adipogranulare (Stadio I) (ADG) (\*), osservato con obiettivo 10X.

La foto B mostra la formazione dell'epitelio germinativo (Stadio II), osservato con obiettivo 20X, le frecce indicano la localizzazione dell'epitelio germinativo.

La foto C mostra la gonade femminile in fase matura (Stadio IV) si evidenzia il follicolo contenente ovociti vitello genici, osservazione a 20X.

La foto D mostra la gonade maschile in fase matura (Stadio IV) si evidenzia il follicolo contenente spermatozoi, in rosa sono percettibili anche le code, l'osservazione è stata condotta a 20X e con l'asterisco viene indicato il tessuto adipogranulare (ADG).

Inoltre successivamente all'emissione spontanea dei gameti da parte degli organismi sottoposti alla dieta C, sono state effettuate prove di fecondazione, confrontandole con gameti prelevati da organismi presi da habitat naturali (Fig.42).

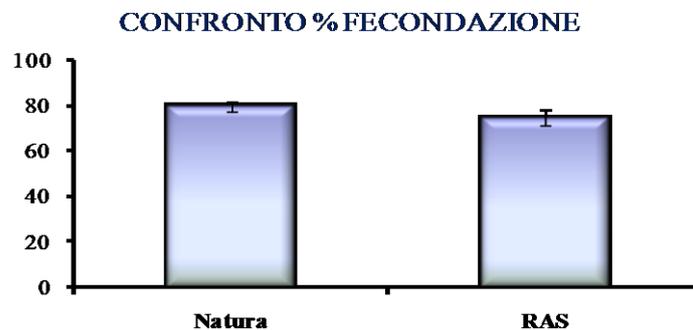


Fig.42: Confronto delle percentuali di fecondazione ottenute tra gameti emessi dagli organismi allevati in RAS e gameti emessi da organismi allevati in habitat naturali.

Non si evincono differenze significative tra le due percentuali di fecondazione, i gameti sembrano provenire da un unico lotto omogeneo di organismi.



#### 4.3.2 Prove di maturazione sessuale a circuito chiuso di *Crassostrea gigas*

La dieta che è risulta idonea per l'esperimento di induzione alla maturazione sessuale di organismi adulti di *Crassostrea gigas* è la Dieta B contenente la maggiore quantità di cellule algali somministrate giornalmente. Al termine dell'esperimento, dalla valutazione visiva delle gonadi, degli organismi sottoposti ad entrambi le diete, sembravano in entrambi i casi molto ingrossate, anche se di colorazione e consistenza diverse.

Successivamente è stata effettuata una prova di fecondazione con i gameti di entrambi gli organismi paragonati a gameti prelevati da organismi provenienti da habitat naturali (Fig.43).

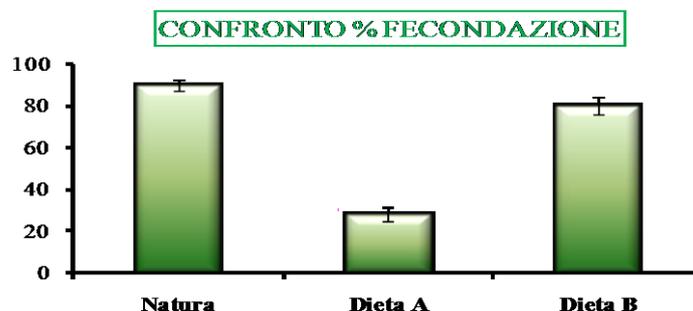


Fig.43: Confronto delle percentuali di fecondazione ottenute tra gameti di organismi allevati in RAS, sottoposti alle due differenti diete, e gameti di organismi prelevati da habitat naturali.

I risultati mostrano che la Dieta B ha generato in 60gg gameti di buona qualità aventi una capacità fecondante paragonabile a gameti prelevati da organismi adulti naturali.



#### 4.3.3 Mantenimento in stand-by emissivo di maturazione della specie *Ostrea edulis*

La stabulazione a circuito chiuso di organismi adulti maturi di *Ostrea edulis* ha mostrato una bassa percentuale di mortalità degli adulti nella fase iniziale di adattamento alle condizioni di allevamento seguita da un completo adattamento degli organismi alle condizioni di allevamento presentando una percentuale di mortalità quasi nulla per tutti i cinque mesi di esperimento (Fig.44).

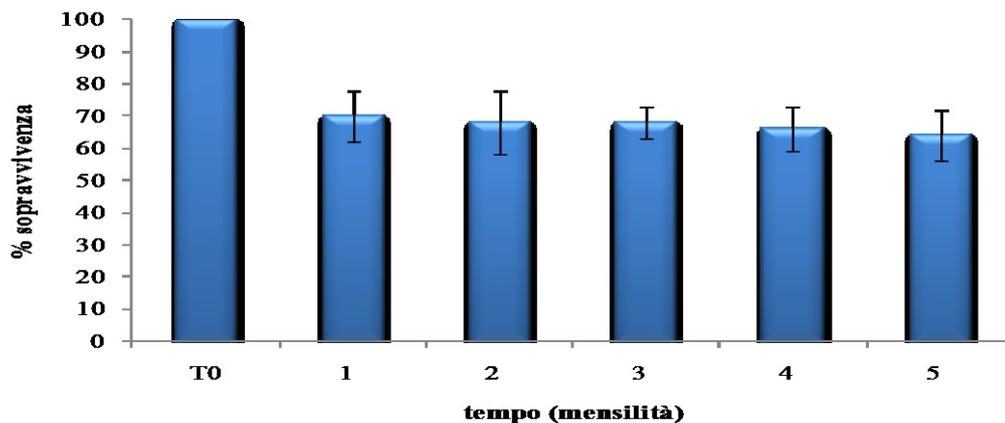


Fig.44: Valori percentuali medi mensili di sopravvivenza degli organismi adulti così stabulati.

Il mantenimento nello stadio di standby di maturazione di adulti di *Ostrea edulis* ha determinato il mantenimento della buona qualità spermatica lungo il periodo della sperimentazione (Fig.45).

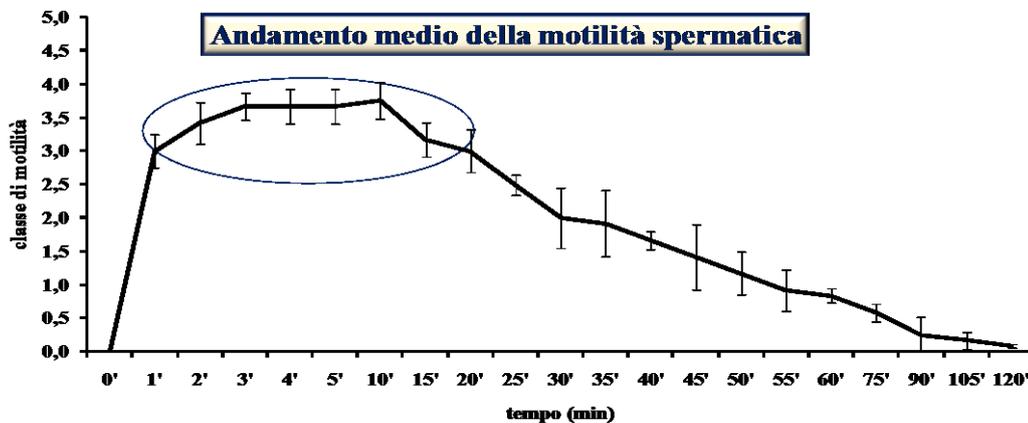


Fig.45: Andamento medio della motilità nel tempo di organismi stabulati in RAS della specie *Ostrea edulis*.

I risultati sono la media delle valutazioni effettuate periodicamente lungo tutto il periodo dell'esperimento, dal grafico si evidenzia il mantenimento della massima classe di motilità per circa 12 min, dato confortante perché simile a quello riscontrato da organismi prelevati in habitat naturale.



#### 4.3.4 Stabulazione a circuito chiuso di organismi adulti della specie *Pecten jacobaeus*

La stabulazione degli adulti a circuito chiuso per circa un anno è stata un successo poiché gli organismi superata la fase di adattamento (il primo mese), in cui si è avuto il maggior tasso di mortalità, hanno mostrato un totale adattamento alle condizioni di allevamento mostrando una costante percentuale di sopravvivenza per tutto il periodo (Fig.46).

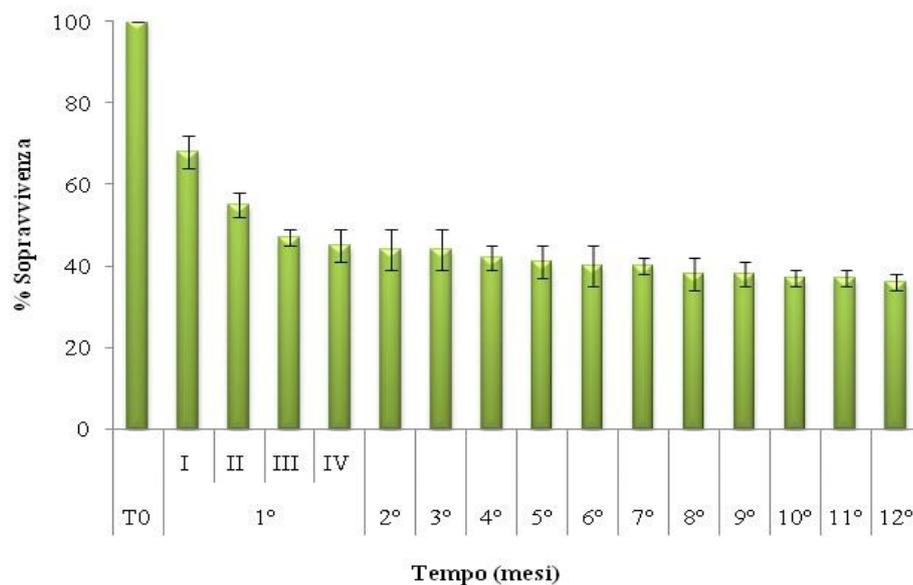


Fig.46: Valori medi mensili della percentuale di sopravvivenza degli organismi stabulati in RAS. In dettaglio le prime quattro settimane di stabulazione.

Gli organismi adulti venivano alimentati con una dieta standard a base di tre ceppi di alghe vive, dieta che ha permesso la maturazione sessuale spontanea fornendoci per circa 6 mesi gameti di buona qualità (Fig.47).

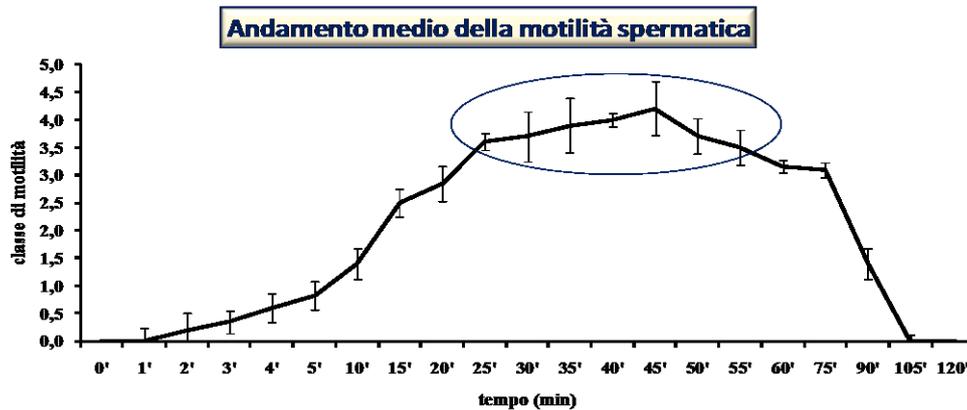


Fig.47: Andamento medio della motilità nel tempo di organismi stabulati in RAS della specie *Pecten jacobaeus*.

Per tutti i campionamenti effettuati si è valutato il valore della massima classe di motilità spermatica degli organismi così allevati (Fig.48)

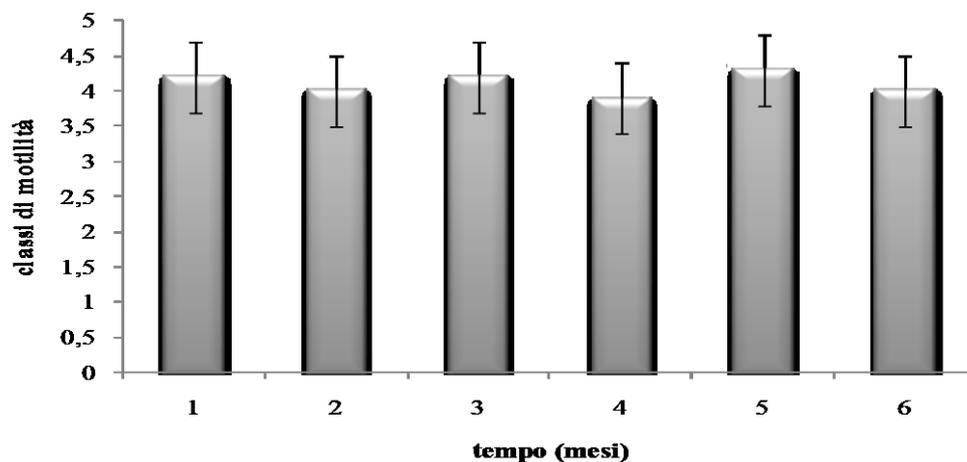


Fig.48: Valori medi della massima classe di motilità raggiunta nei sei mesi di campionamenti.

Dal grafico si evidenzia che hanno mantenuto lo stesso valore di massima motilità raggiunta nei sei mesi di campionamento.

#### 4.4 Sviluppo di protocolli per il mantenimento e l'allevamento di crostacei marini:

In questa fase sperimentale l'obiettivo principale è stato quello di migliorare le performance riproduttive di organismi adulti allevati in piccoli volumi.

#### 4.4.1 *Amphibalanus amphitrite*

##### 4.4.1.1 Valutazione della sopravvivenza degli adulti di *Balanus amphitrite* in due linee di allevamento che utilizzano differenti acque

I due allevamenti sono stati condotti con due differenti acque una è quella del sistema ricirculante (RAS) e l'altra è una acqua marina artificiale Istant Ocean (Fig.49).

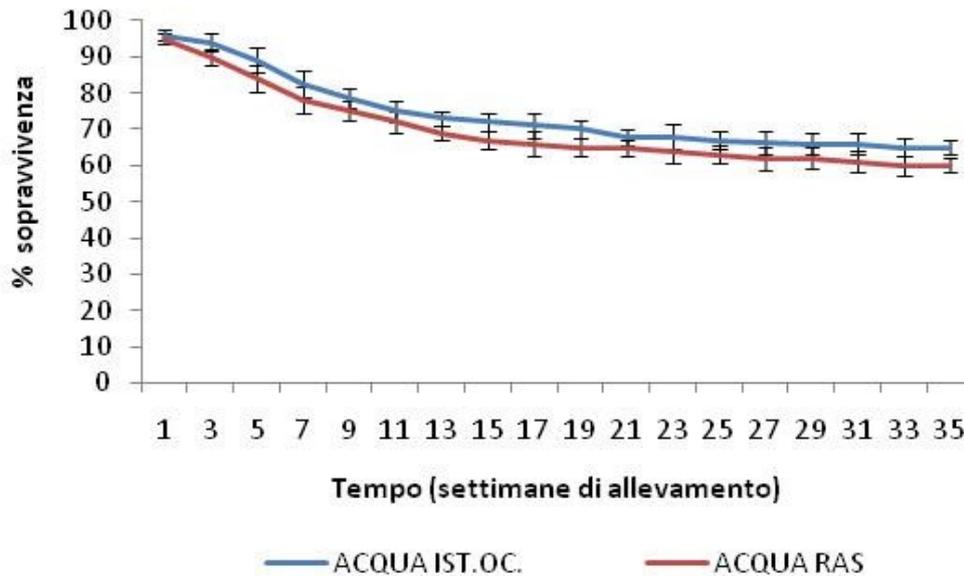


Fig.49: Confronto di sopravvivenza adulti tra organismi allevati in due diverse acque.

Dai risultati di sopravvivenza ottenuti possiamo escludere l'effetto della diversa acqua di allevamento sulla sopravvivenza degli adulti, considerando l'acqua del sistema RAS idonea per il proseguimento della sperimentazione.

##### 4.4.1.2 Miglioramento delle performance riproduttive mediante diete sperimentali

Sono state effettuate prove di alimentazione sugli adulti utilizzando due diete aventi gli stessi costituenti ma differenti quantità. La dieta A mostra una percentuale media settimanale di sopravvivenza degli adulti del 60-65% mentre la dieta B mostra una percentuale media settimanale di sopravvivenza degli adulti dell'80-90%. Inoltre le due diete hanno avuto effetto sul numero di naupli prodotti ad ogni evento bisettimanale di emissione (Fig.50).

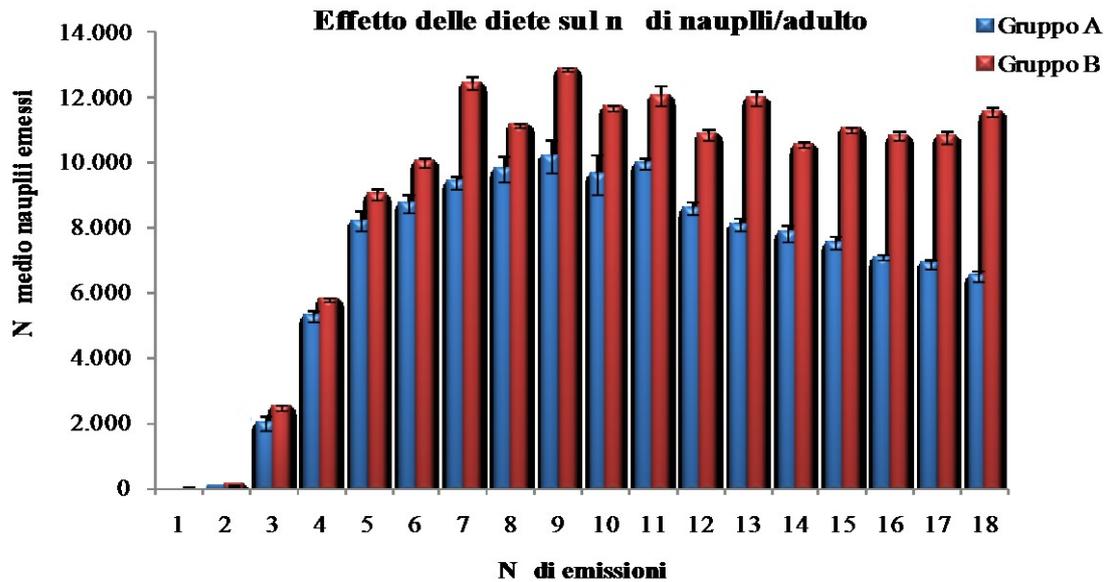


Fig.50: Effetto delle diete sperimentate sul numero di naupli emessi da parte di ogni adulto allevato.

Dal grafico si evidenzia che la dieta B (raddoppiata nelle quantità) non solo mostra degli effetti sulla sopravvivenza degli adulti ma mostra un significativo effetto positivo sulla produzione naupliare, aumentando il numero di naupli emessi da parte di ogni adulto di circa il 30%, per ciascuna emissione a partire dalla diciottesima settimana (9 evento emissivo).

#### 4.4.2 *Tigriopus fulvus*

##### 4.4.2.1 Valutazione della sopravvivenza degli adulti di *Tigriopus fulvus* in due linee di allevamento che utilizzano differenti acque e miglioramento delle performance riproduttive mediante diete sperimentali.

Come per i cirripedi anche per i copepodi arparticoidi *Tigriopus fulvus* la differente acqua non presenta effetti sulla sopravvivenza degli adulti. Sono state testate 5 diete costituite in modo differente da miscele di microalghe ed alimento inerte per pesci esotici. E' stato valutato l'effetto delle diete sul numero di naupli emessi da ogni femmina ovigera (Fig.51)



Fig.51: Effetto delle diete sperimentali sul numero di naupli generati da ogni femmina ovigera.

La dieta B costituita esclusivamente da una miscela algale contenente la maggiore quantità di cellule si è mostrata la più idonea per l'ottenimento di un maggior numero di naupli ad ogni evento di rilascio dei naupli da parte degli adulti.

#### 4.5 Validazione dei protocolli gestionali e produttivi mediante valutazione della qualità dei gameti, embrioni e giovanili degli organismi allevati a circuito chiuso:

In questa fase vengono eseguiti diversi saggi di sviluppo e valutazioni qualitative dei gameti per tutte le specie considerate sia di molluschi che di crostacei avendo come controlli organismi presi da habitat naturali.

##### 4.5.1 Confronto di sviluppo a larva D di embrioni di *Mytilus galloprovincialis*

Vengono messi a confronto prove di sviluppo embrionale degli organismi allevati in RAS con organismi prelevati da habitat naturali (Fig.52)

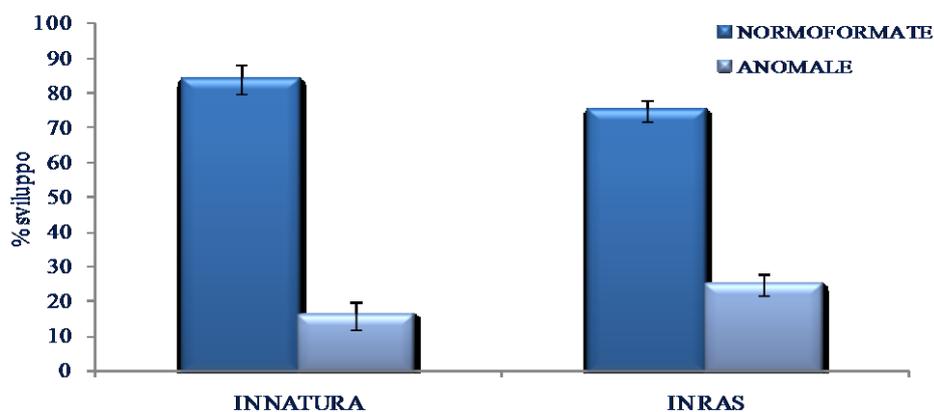


Fig.52: Percentuali di sviluppo a larva D di embrioni di *Mytilus galloprovincialis*

Dalla valutazione del saggio di sviluppo non si evincono differenze significative tra la percentuale di normale sviluppo degli embrioni, generati da gameti prodotti da organismi allevati in RAS rispetto agli embrioni generati da organismi prelevati in natura.

#### 4.5.2 Confronto sviluppo a larva D di embrioni di *Crassostrea gigas*

Confronto di sviluppo embrionale tra embrioni generati da organismi allevati in RAS con organismi prelevati in habitat naturali (Fig.53).

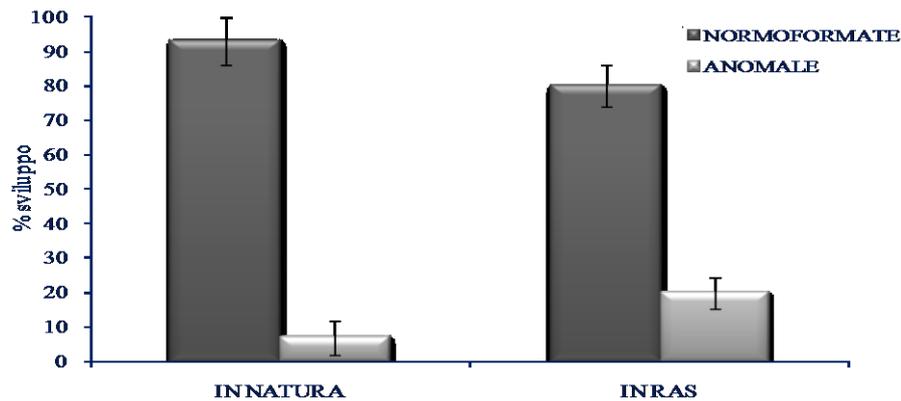


Fig.53: Percentuali di sviluppo a larva D di embrioni di *Crassostrea gigas*

Anche qui non si evincono differenze significative tra organismi naturali e quelli allevati in RAS.

#### 4.5.3 Andamento della motilità spermatica di organismi allevati in RAS messi a confronto con organismi naturali della specie *Ostrea edulis*

L'andamento della motilità spermatica di organismi allevati in RAS viene messo a confronto con l'andamento della motilità spermatica di organismi prelevati da habitat naturali (Fig.54)

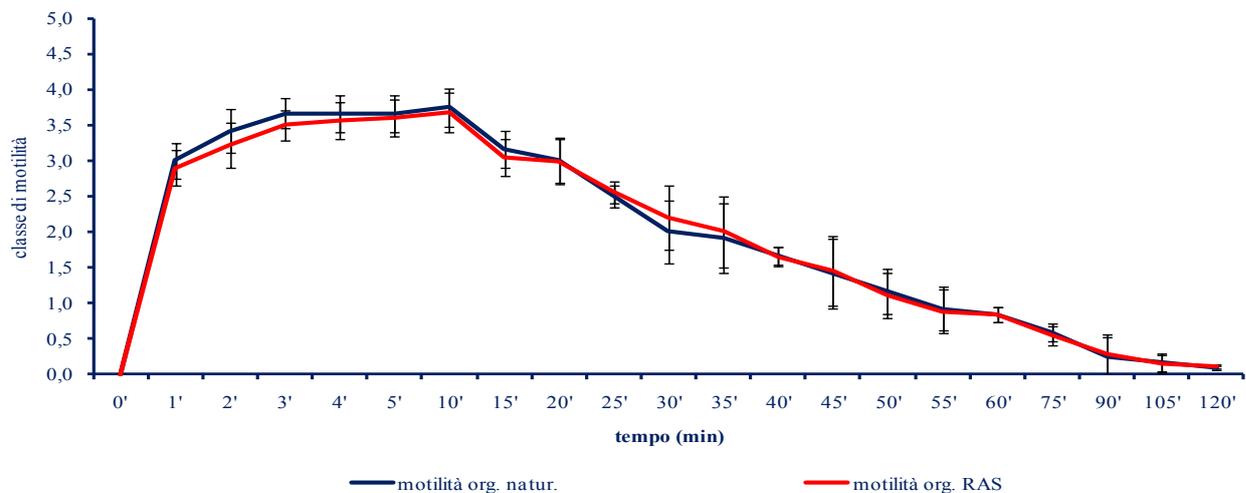


Fig.54: Confronto andamento motilità spermatica di org. allevati in RAS con org. prelevati in natura della specie *Ostrea edulis*

Dal grafico si evince che i due andamenti di motilità nel tempo sono molto simili e per entrambi i gruppi di gameti il raggiungimento della massima classe di motilità è circa intorno al valore di classe 3-3,5.

#### 4.5.4 Andamento della motilità spermatica di organismi allevati in RAS messi a confronto con organismi naturali della specie *Pecten jacobaeus*

La valutazione della qualità spermatica degli organismi adulti stabulati a circuito chiuso del nostro sistema RAS è stata messa a confronto con l'andamento della motilità spermatica nel tempo di gameti prelevati da organismi pescati in natura (Fig.55)

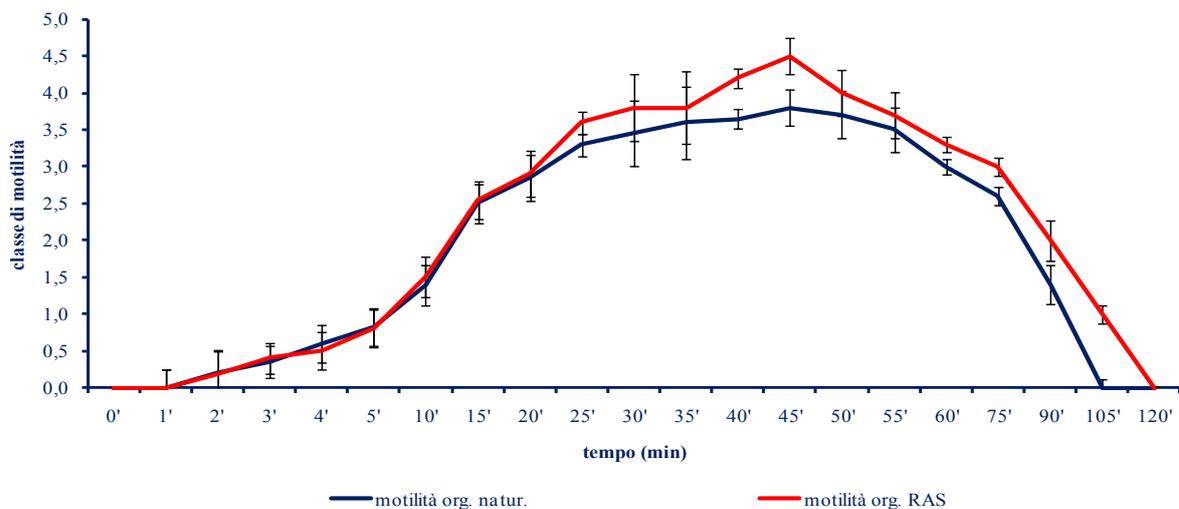


Fig.55: Confronto andamento motilità spermatica di organismi allevati in RAS con organismi prelevati in natura della specie *Pecten jacobaeus*

Dal grafico si evidenzia che l'andamento della motilità spermatica nel tempo è molto simile per entrambi i gameti, i gameti degli organismi stabulati in RAS presentano un valore di massima motilità raggiunta superiore a quella dei gameti prelevati da organismi pescati, cosa imputabile allo stress della pesca e del trasporto in laboratorio.

#### 4.5.5 Confronto percentuali di sopravvivenza di naupli del cirripede *Balanus amphitrite*

E' stato simulato un saggio ecotossicologico sottoponendo naupli generati da organismi adulti allevati in RAS e naupli prodotti da organismi prelevati da habitat naturali ad un acqua artificiale standard ASTM e ne è stata valutata la percentuale di sopravvivenza dopo 48 ore (Fig.56).

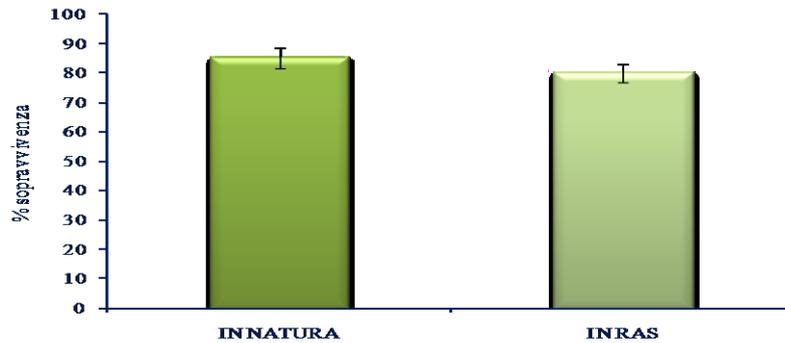


Fig.56: Confronto di sopravvivenza di naupli di *Balanus amphitrite*

I naupli sembrano essere generati da un unico lotto omogeneo di organismi adulti poiché non presentano differenze significative riguardo alle percentuali di sopravvivenza ed inoltre il comportamento natante espresso durante il test sembrava essere identico.

#### 4.5.6 Confronto percentuali di sopravvivenza di naupli del copepode arparticoide *Tigriopus fulvus*

Allo stesso modo anche per i naupli di *Tigriopus fulvus* è stata valutata la percentuale di sopravvivenza 48 ore dopo l'esposizione all'acqua ASTM e messa a confronto con naupli generati da organismi prelevati in natura (Fig.57)

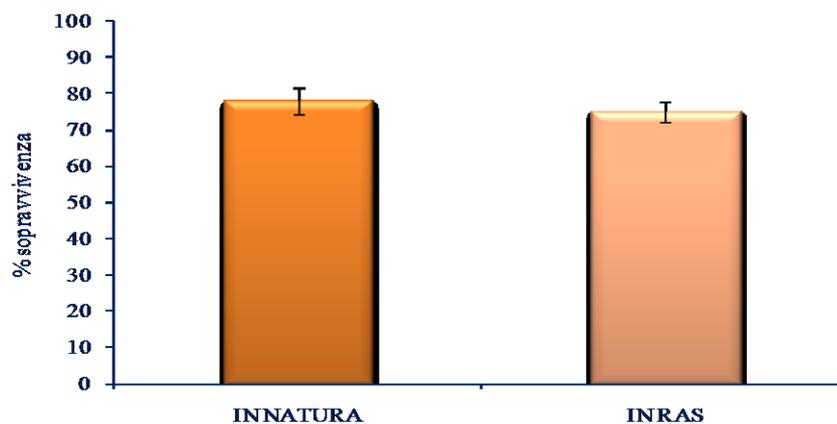


Fig.27: Confronto di sopravvivenza di naupli di *Tigriopus fulvus*

Il grafico non evidenzia alcuna differenza significativa tra i due gruppi di naupli per cui si esclude ogni effetto dell'acqua del sistema RAS sulla fisiologia riproduttiva dell'organismo adulto e sulla qualità dei naupli prodotti.

# **Capitolo 5**

## **Conclusioni**

La giusta sequenza dei trattamenti e i tempi necessari di permanenza di lotti definiti di acqua da trattare nelle diverse vasche di trattamento ci hanno condotto con successo alla totale gestione della risorsa acqua all'interno del modulo di ricircuitazione idrica (RAS) della Stazione Sperimentale di Salerno del CRIAcq mediante una gestione a lotti/pacchetto e le continue indagini chimico-fisiche, microbiologiche ed ecotossicologiche.

La stessa acqua ci ha permesso di ottenere, per tutta la sperimentazione, produzioni massive di microalghe marine, con tempi di crescita e concentrazioni ripetute nel tempo della sperimentazione. Inoltre le colture algali condotte per tutta la sperimentazione con le stesse acque ricircuitanti del sistema non hanno perso nel tempo le proprietà nutrizionali che possedevano all'inizio dell'allevamento

Nel modulo di stabulazione molluschi del CRIAcq è stato possibile stabulare e condizionare quattro diverse specie di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus*) per poter condurre esperimenti volti alla continua acquisizione di gameti ed embrioni da poter utilizzare per altre ricerche nell'ambito delle scienze acquatiche.

E' Stato elaborato un protocollo sperimentale per l'induzione alla maturazione sessuale di *Mytilus galloprovincialis* e *Crassostrea gigas*, al di fuori delle proprie stagioni riproduttive, mediante prove di alimentazione e ottimizzazione delle condizioni di allevamento. Inoltre è stato possibile stabulare per lungo periodo organismi adulti di *Ostrea edulis* e *Pecten jacobaeus* mantenendoli in uno stadio di maturazione avanzato in modo da poter ottenere gameti di buona qualità per un periodo più prolungato rispetto alla naturale stagione riproduttiva.

L'acqua dell'impianto opportunamente trattata ci ha permesso di condurre e migliorare gli allevamenti di organismi adulti di *Balanus amphitrite* e *Tigriopus fulvus* in modo da avere una disponibilità continua dei loro naupli ormai utilizzati in saggi ecotossicologici standardizzati ed in via di formazione a livello nazionale per la valutazione della qualità delle acque marino-costiere.

Infine la validazione delle potenzialità del sistema Ras del CRIAcq è stato confermato dalla qualità dei gameti, embrioni ed organismi giovanili di tutte le specie considerate in questa sperimentazione.

## Bibliografia

Abascal F.J., Cosson J., Fauvel C. (2007) Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *J. Fish Biol.* 70: 509-522

Ackefors, H. and Enell, M., 1994. The release of nutrients and organic matter from aquaculture systems in Nordic countries. *Journal of Applied Ichthyology* 10, pp. 225–241;

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

Acosta-Salmón H., D.J. Jerry, P.C Southgate. 2007. Effects of cryoprotectant agents and freezing protocol on motility of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L) spermatozoa. *Cryobiology* 54: 13-18

ANZECC 1992. *Water quality guidelines for fresh and marine waters*. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, Australian Government Publishing Service, Canberra.

APAT IRSA-CNR .2003. *Metodi analitici per le acque*. Manuali e Linee guida, 29/2003, Vol. Terzo. Metodo 8060: 1043-1049.

Arizzi Novelli A., Argese E., Tagliapietra D., Bettiol C., Volpi Ghirardini A. (2002) Toxicity of tributyltin and triphenyltin towards early life stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 859-864

Arizzi Novelli, A, C. Losso, P.F. Ghetti and A. Volpi Ghirardini. 2003a. Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): Comparison with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 1295-1301.

ASTM E1525. 1994a. *Standard Guide for Designing Biological Tests With Sediments*. ASTM: 22 pp

ASTM E 2122. 2002. *Standard Guide for Conducting In-situ Field Bioassays With Caged Bivalves*. ASTM: 30 pp.

ASTM E 724. 1998. *Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs*. ASTM: 21 pp.

ASTM E1367. 1999. *Standard Guide for Conducting 10-Day Static Sediment Toxicity Tests With Marine and Estuarine Amphipods*. ASTM: 27 pp.

ASTM E1563. 1995. *Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests With Echinoid Embryos*. ASTM: 20 pp.

Au D.W.T., M.W.L. Chiang. & R.S.S. Wu 2000. Effect of cadmium and phenol on motility and ultrastructure of sea urchin and mussel spermatozoa. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38: 455-463

Beiras R., Bellas J. (2008) Inhibition of embryo development of the *Mytilus galloprovincialis* marine mussel by organic pollutants; assessment of risk for its extensive culture in the Galician Rias. *Aquaculture* 277: 208-212

Beiras R., His E. (1994) Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113: 95–103

Beiras R., His E. (1995) Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 126: 185–189

Beiras R., His E. (1995) Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar. Pollut. Bull.*, 30: 47-49.

Bellas J., Vázquez E., Beiras R. (2001) Toxicity of Hg, Cu, Cd and Cr early development al stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment, *Wat. Res.* 35: 2905-2912

Blancheton, J.P. (2000). *Developments in recirculation systems for Mediterranean fish species*. *Aquacultural Engineering* 22, 17–31

Bougrier S. & Rabenomanana L.D. 1986. Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 58: 277-280

Boyazoglu, J. (1992). *Sustainable Agriculture, Animal Production Development and the Environment*. Symp. on Livestock and the Environment, Korean Society, Seoul, December.

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

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

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

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.
- Calabrese A., Collier R. S., Nelson D. A., MacInnes J. R. (1973) The toxicity of heavy metals to the embryos of the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.* 18: 162–166;
- Cataudella, S. e Bronzi, P. (2001). *Acquacoltura responsabile*. Unimar-Uniprom, Roma, 685 pp.
- Cautadella S., e Bronzi P. Ed. Unimar-Uniprom. pp. 352-374.
- 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.
- Chao N.H., Lin T.T., Chen Y.J., Hsu H.W., Liao I.C., (1997) Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam, *Aquaculture* 155: 31-44
- Chao N-H. & Liao I.C. 2001. Criopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197 (1-4): 161-189
- Chapman P.M., (2002a) Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 7-15
- Chapman P.M., Ho K.T., Munns Jr W.R., Solomon K., Weinstein M.P. (2002b) Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 271-278
- Chapman P.M. (2008) Determining ecological relevance from ecotoxicological studies. Avoiding common pitfalls. In: *Giornate di studio ICRAM “Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti marini e salmastri”*. Viareggio (LU), 25-26 novembre 2008
- Cima F., Ballarin L., Bressa G., Martinucci G., Burighel P. (1996) Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate (*Styela plicata*; Tunicata). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 35: 174–182
- Corrà, C., G. D’Amico, V. Piazza, G. Greco, F. Garaventa, M. Faimali and L. Pane. 2006. Preliminary standardization of a chronic toxicity assay for oil dispersants using *Balanus amphitrite* larvae. *SETAC Europe 16th Annual Meeting, Controversies and Solutions in Environmental Sciences*, 7 - 11 May 2006. The Hague, The Netherlands.
- D’Adamo R., Di Stasio M., Fabbrocini A., Petitto F., Roselli L., Volpe M.G. (2008) Migratory crustaceans as biomonitors of metal pollution in their nursery areas. The Lesina lagoon (SE Italy) as a case study. *Environ. Monit. Assess* 143: 15-24.

Davoren M., Shùilleabhain S.N., O'Halloran J., Hartl M.G.J., Sheenan D., O'Brien N.M., Van Pelt F.N.A.M., Mothershill C. (2005) A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology* 14: 741-755

Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006, Norme in materia ambientale. Gazzetta Ufficiale n.88 del 16 aprile 2006 – suppl. Ord. n.96

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.

Desai, D.V., A.C. Anil and K. Venkat. 2006. Reproduction in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica): influence of temperature and food concentration. *Marine Biology*, 149: 1431–1441.

Di Matteo O., Langellotti A.L., Masullo P. & Sansone G. 2009. Cryopreservation of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) spermatozoa. *Cryobiology* 58: 145-150

Dinnel P.A., Pagano G., Oshida P.S. (1988) A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: R.D. Burke, P.V. Mladenov and R.L. Parsley (Eds.). *Echinoderm Biology, Proceedings of the Sixth International Echinoderm Conference*, Balkema, Rotterdam: 611-619

Drokin S., Stein H., Bartscherer H., (2006) Effect of Cryopreservation on the Fine Structure of Spermatozoa of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta* F. fario), *Cryobiology* 256: 263-270

Embry M.R., Belanger S.E., Braunbeck T.A., Galay-Burgos M., Halder M., Hinton D.E., Léonard M.A., Lillicrap A., Norberg-King T., Whale G. (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research, *Aquatic Toxicology* 97: 79-87, Engelmann, 2004;

Fabbrocini A., Guarino A., Scirocco T., Franchi M., D'Adamo R. (2005) Integrated biomonitoring assessment of the Lesina Lagoon (Southern Adriatic Coast, Italy): preliminary results. *Chem. Ecol.* 21(6): 479-489

Fabbrocini A., Lubrano Lavadera S., Rispoli S. & Sansone G. 2000. Cryopreservation of sea bream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40: 46-53 Fahning et Garcia, 1992).

Faimali, M., Garaventa, F., Terlizzi, A., Chiantore, M. & Cattaneo-Vietti, R. 2004. The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulating *Balanus amphitrite* larval settlement. *J. Expt. Mar. Bio. Eco* 306(1): 37-50.

- Faimali, M., F. Garaventa, V. Piazza, F. Magillo, G. Greco, C. Corrà, E. Giacco, L. Gallus and C. Falugi. 2006c. Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Marine Biology*, 149: 87-96.
- 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.
- FAO (2004). *Hatchery culture of bivalves*. Practical manual. 183 pp.
- Faraponova, O., D. De Pascale, F. Onorati and M.G. Finoia. 2005. *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoda) as a target species in biological assays. *Meiofauna Marina*, 14: 91-95.
- Faraponova, O., M.A. Todaro, F. Onorati e M.G. Finoia. 2003. Sensibilità sesso ed età specifica di *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) nei confronti di due metalli pesanti (Cadmio e Rame). *Bol. Mar. Medit.*, 10 (2): 679-681.
- Filosto S., Roccheri M.C., Bonaventura R., Matranga V. (2008) Environmentally relevant cadmium concentrations affect development and induce apoptosis of *Paracentrotus lividus* larvae cultured in vitro. *Cell Biol. Toxicol.* 24: 603-610
- G.U. supplemento n.4 al n.86 del 10.08.1994. *Determinazioni delle sostanze azotate nei cereali e derivati*.
- Geffard, O., E. His, H. Budzinski, M. Seaman et P. Garrigues. 2001. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée in situ par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*. *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 324: 1149-1155.
- Gelli F., Novi C., Palazzi D., Pregolato L., Trentini P.L., Cicero A.M., Savorelli F., Roncarati A., Melotti P. (2001) Effetti di un tossico di riferimento (Sodio laurilsolfato) sulla schiusa di uova e sulla sopravvivenza di stadi larvali e giovanili di branzino (*Dicentrarchus labrax*). *Atti della Conferenza Internazionale di Acquacoltura*, 26-27 aprile 2001, Verona, 6
- Giaoutzi, M. and Nijkamp, P. (1993). *Decision Support Models for Sustainable Development*. Aldershot, Avebury
- González-Benito M.E. 1998. Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. *Acta Hort.*, 457: 133-142
- Gopalakrishnan S., Thilagam H., Vivek Raja P. (2008) Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermioxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*, *Chemosphere* 71: 515-528

Gordin, H. (1983). *Advances in marine aquaculture in the Red Sea*. Bull. Inst. Oceanogr.Fish. 9, pp.436-432.

Gosling, E. (2003) *Bivalve Molluscs : Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing.

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.

Greco, G., A. Di Fino, C. Corrà, F. Garaventa, M. Pittore and M. Faimali. 2006. Swimming speed alteration assay with *Balanus amphitrite* larvae in environmental samples (sediments elutriates) testing. *SETAC Europe 16th Annual Meeting, Controversies and Solutions in Environmental Sciences*, 7 - 11 May 2006. The Hague, The Netherlands.

Greco, G., C. Corrà, F. Garaventa, E. Chelossi and M. Faimali. 2006b Standardization of laboratory bioassays with *Balanus amphitrite* larvae for preliminary oil dispersants toxicological characterization. *Chemistry and Ecology*, 22(1): 163-172.

Gwo J.C. (1995) Cryopreservation of Oyster (*Crassostrea gigas*) embryos, *Theriogenology* 43: 1163-1174

Gwo J.C. 2000. Cryopreservation of aquatic invertebrate semen: a review. *Aquaculture Research* 33: 259-271

Gwo J.C., Chen C.W. & Cheng H.Y. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology* 58: 1563-1578

Hall LWJr, Alden RWIII (1997) A review of concurrent ambient water column and sediment toxicity testing in the Chesapeake Bay watershed: 1990–1994. *Environ Toxicol Chem* 16:1606–1617

Harvengt L, Meier-Dinkel A, Dumas E, Collin E. 2004. Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research* 34: 43–55.

Hirano T., Godo T., Mii M. & Ishikawa K. 2005. Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports* 23: 534-539

His E., Robert R. (1982) Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole: toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *Crassostrea gigas*. *Revue. Trav. Inst. (scient. tech.) Pêch. Marit.* 45: 117–125

His E., Beiras R. & Seaman M. 1999. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Advances in Marine Biology* 37: 1-178

- His E., Heyvang I., Geffard O. & De Mountadouin X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies. *Water Research* 7: 1706-1718
- His E., Seaman R.N.L. & Beiras R. 1997. A simplified bivalve larval bioassay method for seawater quality assessment. *Water Research* 31: 351-355
- Holdway D.A. (1996) The role of biomarkers in risk assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* 2: 263–267
- ICES (1997) Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment (1997). *ICES Cooperative Research Report* no. 222: 12-20
- Ieropoli S., Masullo P., Do Espirito Santo M. & Sansone G. 2004. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilisation viability of spermatozoa of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49: 250-257
- ISMEA, Il settore ittico in Italia. Check up ittico 2009, Roma, 2010.
- Jamu, D.M., Piedrahita, R.H., 2002. An organic and nitrogen dynamics model for the ecological analysis of integrated aquaculture/agriculture systems I. Model development and calibration. *Environmental Modelling and Software* 17, 571–582.
- Jime'nez-Montealegre, R., 2001. Nitrogen transformation and fluxes in fish ponds: a modeling approach. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands. 185 pp.
- 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.*
- Kawamoto T., Narita T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Komaru A. & Ohta H. 2007. Effects of Cryopreservation methods on post-thaw motility of spermatozoa from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Cryobiology* 5: 19-26
- Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26(4): 239-257
- Kime D.E., Hebraimi M., Nysten K., Roelants I., Rurangwa E., More H.D.M. & Ollevier F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis for monitoring the effect of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metal. *Aquatic Toxicology* 36: 223-237
- Klößner K., Rosenthal H. & Willführ J. 1985. Invertebrate bioassays with North Sea water samples: Structural effects on embryos and larvae of serpulids, oysters and sea urchins. *Helgol Meeresunters* 39: 1-19

- Kwok, K.W. and K.M. Leung. 2005. Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* (Crustacea, Copepoda): effects of temperature and salinity. *Mar. Pollut. Bull.*; 51 (8-12): 830-837.
- Lahnsteiner F., Mansour N., Berger, B. (2004) The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts, *Journal of Fish Biology* 65(5): 1283-1297
- Lam, P.K.S., K.T. Wo and R.S.S. Wu. 2000. Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Environ. Toxicol.*, 15 (1): 8 – 13.
- Lera S., Macchia S., Pellegrini D. (2006) Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environ. Monit. Assess.*, 122: 101-109
- Linhart, O., Rodina, M., Cosson, J. (2000) Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41: 241-250
- Losso, C., E. His, P.F. Ghetti and A. Volpi Ghirardini. 2004. Sensitivity of embryotoxicity test with *Mytilus galloprovincialis* (LMK) towards some compounds of environmental interest (copper and pesticides). *Environ. Technol.*, 25(7):841-846
- Losso, C., M. Picone, A. Arizzi Novelli, E. Delaney, P.F. Ghetti, A. Volpi Ghirardini. 2007. Developing toxicity scores for embryotoxicity tests on elutriates with the sea urchin *Paracentrotus lividus*, the oyster *Crassostrea gigas* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Contam. Toxicol.*, 53, 220–226.
- Lubenz E., Daube N., Pekarsky I., Magnus Y., Cohen A., Yusefovich F. & Feigin P. 1997. Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks - strategies in research and application. *Aquaculture* 155: 13-30
- Macken A., Giltrap M., Ryall K., Foley B., McGovern E., McHugh B., Davoren M. (2009) A test battery approach to the ecotoxicological evaluation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays. *Ecotoxicology* 18: 470-480
- Maisse G., Labbé C., Ogier de Baulny B., Leveroni S. & Haffray P. 1998. Cryopreservation du sperme et des embryons de poissons. *INRA Prod. Anim.* 11: 57-65
- Martin M., Osborn K. E., Billig P., Glickstein N. (1981) Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12(9): 305–308
- Martínez-Páramo S., Pérez-Cerezales S., Gómez-Romano F., Blanco G., Sánchez J.A. & Herráez M.P. 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology* 71: 594-604

- Masullo P., Attianese M., Del Prete F., Langellotti A.L., Sansone G. (2008) Effetti di sostanze xenobiotiche (metalli pesanti) singole ed in miscela sulla sopravvivenza di embrioni di *Sparus aurata*, *Biol. Mar. Med.* 15(1): 166-167
- 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. (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.
- McCarty L.S., Munkittrick K.R. (1996) Environmental biomarkers in aquatic toxicology: Fiction, fantasy or functional? *Human and Ecological Risk Assessment* 2: 268–274
- Micheletti C., Critto A., Carlon C., Marcomini A. (2004) Ecological risk assessment of persistent toxic substances for the clam *Tapes philipinarum* in the Lagoon of Venice, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1575-1582
- Micic M., Bihari N., Labura Z., Müller WEG., Bate R. (2001) Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride, *Aquat Toxicol* 55: 61-73
- Misitano, D.A. and M.H. Schiewe. 1990. Effect of chemically contaminated marine sediment on naupliar production of the marine harpacticoid copepod, *Tigriopus californicus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44 (4): 636-642.
- 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.
- Narita T., Kawamoto T., Isowa K., Aoki H., Hayashi M., Komaru A. & Ohta H. 2008. Fertility of cryopreserved spermatozoa of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture* 275: 178-181

- Narracci M., Cavallo R.A., Acquaviva M.I., Prato E., Biandolino F. (2009) A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Environ. Monit. Assess.* 148: 307-314
- Nascimento A.I., Smith D.H., Pereira S.A., Sampaio de Araujo M.M., Silva M.A.(2000) Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 3: 449-458
- Neori, A. and M. Shpigel and D. Ben-Ezra, 2000. Sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture*, 186: 279-291.
- 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.
- 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.
- Nipper M., Prospero V.A., Zamboni A.J. (1993) Toxicity testing with coastal species of Southeastern Brazil. Echinoderm sperm and embryos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 646-652
- OECD (1992) Fish, Acute Toxicity Test. In: *Guideline for Testing of Chemicals* n°203, adopted 17/07/1992: 9 pp.
- Ozden-Tokatli Y., Akdemir H., Tilkat E. & Onay A. 2010. Current status and conservation of *Pistacia* germplas. *Biotechnology Advances* 28: 130-141
- Pagano G., Cipollaro M., Corsale G., Esposito A., Ragucci E., GiordanoGG., Trieff NM. (1986) The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In: *Cairns Jr (ed) Community Toxicity Testing.* ASTM STP920: 66-92
- Pagano G., Anselmi B., Dinnel P.A., Esposito A., Guida M., Iaccarino M., Melluso G., Pascale M., Trieff N.M. (1993) Effects on sea urchin fertilization and embryogenesis of water and sediment from two rivers in Campania, Italy. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25: 20-26
- Pagano G., His E., Beiras R., De Biase A., Korkina L. G., Iaccarino M., Oral R., Quiniou F., Warnau M., Trieff N.M. (1996) Cytogenetic, developmental, and biochemical effects of aluminium, iron, and their mixture in sea urchins and mussels. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 466–474
- Pagano G., Meriç S., De Biase A., Iaccarino M., Petruzzelli D., Tünay O., Warnau M. (2002) Toxicity of bauxite manufacturing by-products in sea urchin embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*

51: 28-34

Paniagua-Chavez C.G. & Tiersch T.R. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster. *Cryobiology* 43: 211-223

Panis B., Swennen R. & Engelmann F. 2001. Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Hort.* 560: 79-86

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

Piechotta G., Lacorn M., Lang T., Kammann U., Simat T., Jenke HS., Steinhart H. (1999) Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42(1): 50-56

Piedrahita, R.H. (2003). *Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation*. *Aquaculture* 226, 35–44. Pillay, 1992).

Popov A.S., Popova E.V., Nikishina T.V. & Vysotskaya O.N. 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration* 29: 403-410

Poulet S. A., Richer de Forges M., Cueff A., Lennon J.-F. (2003) Double-labelling methods used to diagnose apoptotic and necrotic cell degradations in copepod nauplii, *Marine Biology* 143: 889–895

Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., De Vries, J. W., Schweizer, T. F. & Harland, B. (1985) The determination of total dietary fiber in foods, food products: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 677–679.

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.

Raisuddin S., Kwok K.W.H., Leung K.M.Y., Schlenk D., Lee J.-S. (2007) The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. Review, *Aquatic Toxicology* 83: 161-173

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

Rey F., González M., Zayas M.A., Stoker C., Durando M., Luque EH., Muñoz-de-Toro M. (2009) Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*, *Gen Comp Endocrinol.* 162(3): 286-292

- Rosety M., Ordoñez F.J., Rosety-Rodríguez M., Rosety J.M., Rosety I. (2003) In vitro acute toxicity of anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the motility of gilthead (*Sparus aurata*, L.) sperm. *Histol. Histopathol.* 18: 475-478
- Rurangwa E., Biegniewska A., Slominska E., Skorkowski E.F., Ollevier F.(2002) Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comp. Biochem. Physiol.* Part C 131: 335-344
- Sansone G., Fabbrocini A., Ieropoli S., Langellotti A.L., Occidente M. & Matassino D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44: 229-239
- Saroglia, M. (2001). *Sistemi a ricircuitazione idrica*. In: *Acquacoltura Responsabile*. A cura
- Sarvi K., Niksirat H., Mojazi Amiri B., Mirtorabi S.M., Rafiee G.R., Bakhtiyari M. (2006) Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*), *Aquaculture* 256: 564-569
- Seed R. (1975). *Reproduction in Mytilus (MOLLUSCA: BIVALVIA) in European waters*. Pubbl. Staz. Zool. Napoli 19: 317-334.
- Shpigel m. e BlaylockRA. 1991. L'ostrica pacifica, gigas della crassostrea, come un filtro biologico per uno stagno di acquicoltura dei pesci di mare. *Acquicoltura* 92: 187-197
- Shpigel, M., Neori, A., Marshall, A., Lupatsch, I., (1996). *Propagation of the abalone Haliotis tuberculata in land-based system in Eilat Israel*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 27, pp. 435-442.
- Shpigel, M., Neori, A., Popper, D. M., Gordin, H. 1993. *A proposed model for "environmentally clean" land-based culture of fish, bivalves and seaweeds*. *Aquaculture* 117, pp.115-128
- Shpigeland Fridtnan (1990),
- Smith J.F., Pugh P.A., Tervit H.R., Roberts R.D., Janke A.R., Kaspar H.F. & Adams S.L. 2001. Cryopreservation of shellfish sperm, eggs and embryos,.*Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 61: 31-34
- Spotte, S. (1979). *Fish and Invertebrate culture: Water management in closed systems*. 2nd ed. John Wiley and Sons, Toronto. 179 p.
- Staeger W.H. 1974. Cryobiological investigations of the gametes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. M.S. thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, 45
- Stickney, R. (2000). *Enciclopedia of Aquaculture*. Wiley & Sons Inc.

- Tancioni, L. e Scardi, M. (2001). *Ecologia in acquacoltura*. In: Acquacoltura Responsabile.
- Tatsumi T., Shiraishi J., Keira N., Akashi K., Mano A., Yamanaka S., Matoba S., Fushiki S., Fliss H., Nakagawa M. (2003) Intracellular ATP is required for mitochondrial apoptotic pathways in isolated hypoxic rat cardiac myocytes, *Cardiovasc Res* 59(2): 428-440
- Todaro, M.A., O. Faraponova, F. Onorati, D. Pellegrini e P. Tongiorgi. 2001. *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoda) una possibile specie-target nella valutazione della tossicità dei fanghi portuali: ciclo vitale e prove tossicologiche preliminari. *Bol. Mar. Medit.*, 8 (1): 896-872.
- Trevor and Iwama, 1991. O.J. Trevor and G.K. Iwama, Polyculture of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), with Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aquaculture* 92 (1991), pp. 313–322.
- Trotta, P. (2001). *Vegetali acquatici*. In: Acquacoltura Responsabile. A cura di Cautadella S., e Bronzi P. Ed. Unimar-Uniprom. pp. 154-175.
- Turolla E., Castaldelli G., Barbin L. e Rossi R., 2002, Induzione all'emissione dei gameti in *Mytilus galloprovincialis* mediante l'impiego di due stimolanti chimici (KCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Biol. Mar. Medit.*, 10 (2): 490-491.
- US EPA (1995) Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms. EPA/600/R-95/136, Cincinnati, Ohio, U.S.
- Van der Horst G., Dott H.M., Samuels J.E. & Genade A. 1985. Short-term and long-term storage of viable oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. *S. Afr. J. Sci.* 81: 404-405
- Vashchenko M. A., Zhadan P. M., Malakhov V. V., Medvedeva L. A. (1995) Toxic effect of mercury chloride on gametes and embryos in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Russ. J. Mar. Biol.* 21(5): 300–307
- Vernberg W.B., Calabrese A., Thurberg F.P., Vernberg F.J. (1982) *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*, Academic Press, London, UK, 564 pp
- Vlasova G. A., Khristoforova N. K. (1982) The effect of cadmium on early ontogenesis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Sov. J. Mar. Biol.* 8(4): 210–215
- Volpi Ghirardini A., Losso C., Arizzi Novelli A., Baù A., His E., Ghetti P.F. (2005) *Mytilus galloprovincialis* as bioindicator in embryotoxicity testing to evaluate sediment quality in the lagoon of Venice (Italy), *Chemistry and Ecology*, 21(6): 455-463
- Warnau M., Iaccarino M., de Biase A., Tempra A., Jangoux M., Dubois P., Pagano G. (1996) Spermotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *P. lividus*. *Environ. Toxicol.*

*Chem.* 15: 1931-1936

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

Yankson K. & Moyse J. 1991. Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other oysters. *Aquaculture* 97: 259-267

Zell S.R., Bamford M.H. & Hidu H. 1979. Cryopreservation of spermatozoa of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Cryobiology* 16: 448-460

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