



REGIONE
PUGLIA



FEAMP

PO 2014-2020
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE, BIOTECNOLOGIE
E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020

MISURA 2.47 - INNOVAZIONE ART. 47 REG. 5081/2014
NUMERO IDENTIFICATIVO PROGETTO: 0003/INA/20

APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE

Responsabile scientifico: prof. Giuseppe Corriero



2
Il riciclo di marittimo

Recupero della coltura di specie
autoctone con alto valore commerciale,
come l'ostrica piatta (*Ostrea edulis*)



ATTIVITÀ



3
Allevamento di nuove specie, invertebrati marini filtratori e alghe,
in grado di ridurre l'impatto degli allevamenti ittici attraverso
azioni di *bioremediation*



4
Indagine sugli aspetti ambientali e sanitari

RELAZIONE FINALE TECNICO-SCIENTIFICA

NOVEMBRE 2023



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

Dipartimento di **Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente**
Dipartimento di **Medicina Veterinaria**

PO FEAMP 2014/2020

Misura **2.47** - Innovazione art. **47** Reg. **508/2014**

Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20

APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE

Responsabile scientifico: **prof. Giuseppe Corriero**

- ATTIVITÀ 1** **Recupero della coltura di specie autoctone con alto valore commerciale, come l'ostrica piatta (*Ostrea edulis*)**
- ATTIVITÀ 2** **Il riccio di mare**
- ATTIVITÀ 3** **Allevamento di nuove specie, invertebrati marini filtratori e alghe, in grado di ridurre l'impatto degli allevamenti ittici attraverso azioni di *bioremediation***
- ATTIVITÀ 4** **Indagine sugli aspetti ambientali e sanitari**

RELAZIONE FINALE TECNICO-SCIENTIFICA

Novembre **2023**

INDICE GENERALE

ATTIVITÀ 1 **Recupero della coltura di specie autoctone con alto valore commerciale, come l'ostrica piatta (*Ostrea edulis*)**

1	INTRODUZIONE	8
2	MATERIALI E METODI	10
2.1	FASE 1	11
2.1.1	Avvio delle attività	11
2.1.2	Allestimento collettori larve e posizionamento in mare	11
2.1.3	Monitoraggio dell'impianto e dei riproduttori	16
2.1.4	Monitoraggio dell'insediamento di larve presso i collettori	21
2.2	FASE 2	27
2.2.1	Allestimento laboratorio/stabulario per riproduzione controllata	27
2.2.2	Stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate	33
2.2.3	Allestimento e manutenzione del laboratorio mobile e stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate	35
2.2.4	Monitoraggio del successo riproduttivo in condizioni controllate e raccolta larve	42
3	RISULTATI	43
3.1	PARAMETRI CHIMICO-FISICI RILEVATI DURANTE IL MONITORAGGIO DELL'IMPIANTO <i>IN SITU</i>	43
3.2	MONITORAGGIO DELL'INSEDIAMENTO DI LARVE PRESSO I COLLETTORI	46
3.3	MONITORAGGIO DELLA RIPRODUZIONE IN AMBIENTE CONTROLLATO	48
4	CONSIDERAZIONI FINALI	50
4.1	PROSPETTIVE PER IL RECUPERO DELLA COLTURA DI <i>O. EDULIS</i>	52
5	BIBLIOGRAFIA	54

ATTIVITÀ 2 **Il riccio di mare** **55**

ATTIVITÀ 3 **Allevamento di nuove specie, invertebrati marini filtratori e alghe, in grado di ridurre l'impatto degli allevamenti ittici attraverso azioni di *bioremediation***

SINTESI DELLE ATTIVITÀ SVOLTE	101
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	105
CAPITOLO 2 FASE 1: SPERIMENTAZIONE DEL PROTOTIPO DI SISTEMA DI ALLEVAMENTO MULTI-TROFICO AD INVERTEBRATI E ALGHE IN LABORATORIO	126
CAPITOLO 3 FASE 2: SPERIMENTAZIONE DEL PROTOTIPO DI SISTEMA DI ALLEVAMENTO MULTI-TROFICO AD INVERTEBRATI E ALGHE IN CAMPO	170
CAPITOLO 4 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	204
CAPITOLO 5 BIBLIOGRAFIA	208

ATTIVITÀ 4 **Indagine sugli aspetti ambientali e sanitari** **221**

RECUPERO DELLA COLTURA DI SPECIE AUTOCTONE CON ALTO VALORE COMMERCIALE, COME L'OSTRICA PIATTA (*OSTREA EDULIS*)

ATTIVITÀ 1 • FASE 1

APPROCCI
INNOVATIVI
PER UNA
ACQUACOLTURA
INTEGRATA
E SOSTENIBILE

MISURA **2.47**

NOVEMBRE 2023

RESPONSABILE SCIENTIFICO: ROBERTO CARLUCCI

COLLABORATORI:

MAURIZIO INGROSSO, FELICE ANGIULLI, DANIELA CASCIONE, ANGELICA CATACCIO, CARLA CHERUBINI, GIULIA CIPRIANO, MARIO IMPERATRICE, ANGELO RAIMONDI, MARIARENO, PASQUALE RICCI, ANGELO TURSI



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE (DBBA)



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
Fondo Europeo per gli
Affari Marittimi e la Pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
TRATTAMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifica + Novembre 2023



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

Dipartimento di **Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente**

PO FEAMP 2014/2020

Misura **2.47** - Innovazione art. **47** Reg. **508/2014**

Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20

APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE

ATTIVITÀ 1 **Recupero della coltura di specie
autoctone con alto valore
commerciale, come l'ostrica piatta
(*Ostrea edulis*)**

INDICE

PREMESSA	7
1 INTRODUZIONE	8
2 MATERIALI E METODI	10
2.1 FASE 1	11
2.1.1 Avvio delle attività	11
2.1.2 Allestimento collettori larve e posizionamento in mare	11
2.1.3 Monitoraggio dell'impianto e dei riproduttori	16
2.1.4 Monitoraggio dell'insediamento di larve presso i collettori	21
2.2 FASE 2	27
2.2.1 Allestimento laboratorio/stabulario per riproduzione controllata	27
2.2.2 Stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate	33
2.2.3 Allestimento e manutenzione del laboratorio mobile e stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate	35
2.2.4 Monitoraggio del successo riproduttivo in condizioni controllate e raccolta larve	42
3 RISULTATI	43
3.1 PARAMETRI CHIMICO-FISICI RILEVATI DURANTE IL MONITORAGGIO DELL'IMPIANTO <i>IN SITU</i>	43
3.2 MONITORAGGIO DELL'INSEDIAMENTO DI LARVE PRESSO I COLLETTORI	46
3.3 MONITORAGGIO DELLA RIPRODUZIONE IN AMBIENTE CONTROLLATO	48
4 CONSIDERAZIONI FINALI	50
4.1 PROSPETTIVE PER IL RECUPERO DELLA COLTURA DI <i>O. EDULIS</i>	52
5 BIBLIOGRAFIA	54

PREMESSA

La presente relazione è stata redatta in accordo con le finalità riportate nel Progetto “**ATTIVITÀ 1: Recupero della coltura di specie autoctone con alto valore commerciale, come l’ostrica piatta (*Ostrea edulis*)**”. Tale progetto è finanziato nell’ambito del Fondo europeo per gli affari marittimi e la pesca (FEAMP-PO 2014-2020), Misura 2.47 della Regione Puglia “Approcci innovativi per una acquacoltura integrata e sostenibile”.

L’elaborato descrive le azioni svolte nella **Fase 1** e nella **Fase 2** dell’**Attività 1**, seguendo le specifiche riportate nel MODELLO ATTUATIVO DELL’ORGANISMO INTERMEDIO – ALLEGATO IV – *Nota esplicativa per la descrizione del progetto*.

In particolare, si evidenzia che le attività sperimentali in mare sono state svolte nel I Seno del Mar Piccolo di Taranto, nell’ambito della collaborazione progettuale intercorrente tra il Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente e il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell’Università di Bari Aldo Moro, e grazie alla disponibilità non onerosa offerta dall’impresa acquicola Coop. “La Sciaia”, titolare della concessione n. 22/2013, localizzata, appunto, nel I Seno del Mar Piccolo di Taranto, area eletta a sito di sperimentazione.

Le attività sperimentali di incubazione e riproduzione a terra sono state svolte in un’area preposta presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell’Università di Bari Aldo Moro, dove è stato allestito un laboratorio attrezzato con lo stato dell’arte di uno schiuditoio e di una camera algale, appositamente orientati al mantenimento dei riproduttori di ostrica piatta *O. edulis*, alla produzione ed al mantenimento delle loro larve. La finalità perseguita in questa attività di studio e ricerca è stata indirizzata all’obiettivo di un reperimento massivo e controllato di giovanili di ostrica piatta come condizione necessaria alla risoluzione della fase critica nel suo ciclo produttivo, ovvero la raccolta del seme, oggi realizzata esclusivamente in mare, da incanalare verso attività di ingrasso a fini commerciali. In buona sostanza, abbiamo allestito una infrastruttura, su scala di progetto pilota, e maturato un’esperienza tecnico-scientifica atualizzata al rilancio di un’attività produttiva moderna e sostenibile, quale appunto la raccolta e commercializzazione di ostriche piatte nei mari di Taranto.



1 INTRODUZIONE

L'ostrica piatta (*Ostrea edulis*) rappresenta una specie ubiquitaria del Mar Mediterraneo (Edwards 2005; Airoidi & Beck, 2007) distinguibile dalle altre ostriche presenti sui mercati italiani ed esteri per la forma delle valve, che sono tondeggianti e piatte e per il sapore più delicato. La pratica tradizionale di coltivazione dell'ostrica piatta veniva condotta sfruttando l'immersione in mare di fascine di lentisco (*Pistacia lentiscus*), per la captazione del seme e successive ulteriori operazioni di manodopera. Tale condizione, associata all'insorgenza di eventi di mortalità causati da agenti parassitari (Mirella da Silva et al., 2005), ha portato molti allevatori all'abbandono dell'attività (Carlucci et al., 2010).

Attualmente, seppure fortemente richiesta sul mercato nazionale ed estero, la produzione di ostrica piatta è limitata (FAO Fishery Statistic, 2006) in quanto risulta fortemente condizionata nella fase iniziale del ciclo produttivo che, utilizzando metodi tradizionali, comporta una dispendiosa ed antieconomica manodopera per il reperimento delle larve.

Per fronteggiare questa scarsa efficienza e riproporre sul mercato tale pratica culturale è necessario mettere a punto nuove metodologie di reperimento del seme, attraverso l'impiego di collettori ad alta efficienza o, eventualmente, l'approvvigionamento di seme ottenuto in laboratorio attraverso l'induzione della riproduzione controllata ed il mantenimento delle larve.

Tale possibilità trova nell'area del Mar Piccolo di Taranto delle condizioni particolarmente favorevoli, in quanto in tale area, i parassiti *Marteilia refringens* e *Bonamia ostreae* non sono mai stati riscontrati (Tiscar et al., 2002; Tieri et al., 2006; Narcisi et al., 2010); inoltre, qui l'ostrica piatta è stata tradizionalmente raccolta grazie alle favorevoli condizioni ecologiche del bacino (Panetta & Dell'Angelo, 1975; Pastore, 1980; Alabiso et al., 2005).

Le azioni previste nell'Attività 1 "Recupero della coltura di specie autoctone con alto valore commerciale, come l'ostrica piatta *Ostrea edulis*" sono state articolate in due fasi. La prima fase (**Fase 1**) è stata incentrata sull'utilizzo di collettori delle larve tecnologicamente più idonei alla cattura del seme selvatico, da immergere presso uno specchio acqueo autorizzato con regolare concessione, nel Mar Piccolo di Taranto (Mar Ionio settentrionale) (Fig. 1.A). La seconda fase (**Fase 2**) è stata soprattutto focalizzata sulla riproduzione indotta delle ostriche piatte mantenute in stabulazione in condizione controllate. Tale fase si è svolta presso un laboratorio allestito con lo stato dell'arte di uno schiudatoio e di una camera algale, appositamente orientati al mantenimento dei riproduttori di ostrica piatta *O. edulis*, alla produzione ed al mantenimento delle loro larve in accrescimento, dedicando

particolare attenzione ai flussi dinamici dell'acqua e al monitoraggio dei parametri chimico-fisici della stessa e provando a superare il *gap* tecnologico che presentano gli attuali sistemi di riproduzione e allevamento presenti sul mercato.

Le due Fasi di progetto si sono dunque articolate in modo tale da rispondere alle necessità di ottimizzazione ed efficientamento della procedura di allevamento e di riproduzione con captazione del seme e delle larve della specie *Ostrea edulis* (Tab. 1.a).

Tab. 1.a – Descrizione delle attività.

Attività	Descrizione
1.1	Allestimento collettori larve e posizionamento in mare
1.2	Allestimento laboratorio/stabulario per riproduzione controllata
1.3	Raccolta larve di ostrica su collettori in mare
1.4	Stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate e raccolta larve
1.5	Immersione in mare dei lotti di giovanili di ostrica selvatica o da laboratorio nei lanternet per accrescimento
1.6	Elaborazione ed analisi finale dei dati

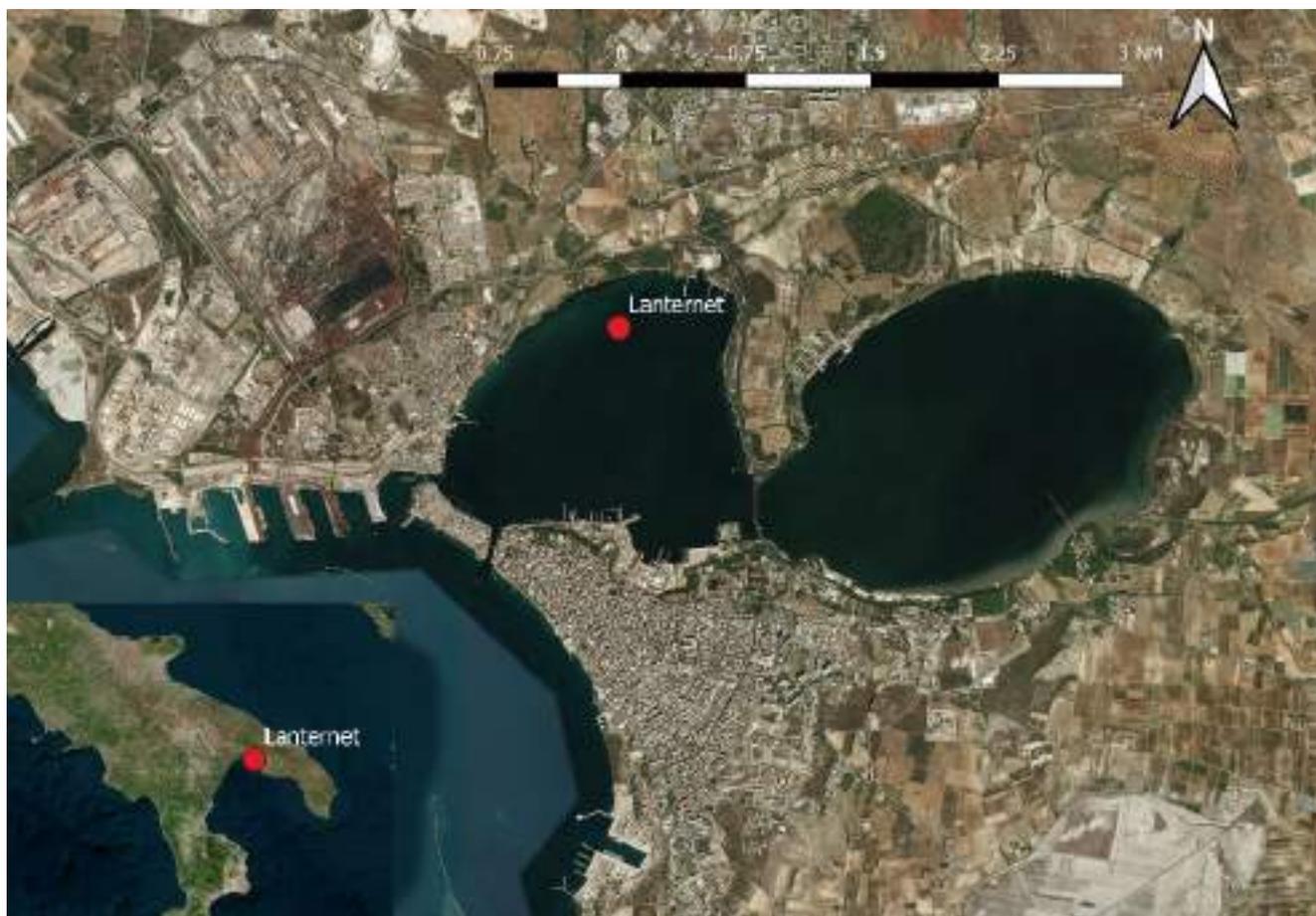


Fig. 1.A – Stazione di monitoraggio *in situ*.

2 MATERIALI E METODI

Una fase preliminare di coordinamento e organizzazione tra i vari partner dell'Attività 1 del Progetto è stata incentrata nella programmazione delle azioni chiave da svolgere durante entrambe le fasi al fine di garantire il completamento delle Attività poste in essere dal progetto e riportate in Tab. 1.a.

A tal riguardo, le azioni pianificate per la **Fase 1** hanno riguardato:

- Redazione di un protocollo delle misure da realizzare e di un calendario opportuno di pianificazione di tutte le azioni.
- Definizione delle caratteristiche delle strutture di allevamento e stabulazione sia in mare che in laboratorio.
- Definizione ed implementazione del protocollo di campionamento e di monitoraggio dei riproduttori e dei parametri chimico fisici *in situ*.
- Immersione e monitoraggio *in situ* dell'impianto di captazione delle larve e successivamente degli individui riproduttori presso i collettori.

Le azioni pianificate per la **Fase 2** hanno riguardato:

- Allestimento di uno stabulario provvisorio e della camera algale.
- Collocazione in vasca dei riproduttori, realizzazione dei collettori e messa in acqua degli stessi.
- Allestimento dello stabulario mobile.
- Monitoraggio dello stato di salute dei riproduttori, dei parametri chimico-fisici dell'acqua della vasca.
- Ricerca delle larve in acqua e sui collettori.

Successivamente è stato previsto l'allevamento dei nuovi esemplari di ostriche.

2.1 FASE 1

2.1.1 Avvio delle attività

All'avvio della Fase 1 sono stati condotti incontri di coordinamento tra i responsabili della Coop. "La Sciaia" e del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente dell'Università degli studi di Bari Aldo Moro e del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro al fine di concordare le azioni necessarie per la realizzazione della sperimentazione e della logistica ad essa connessa. Infine, si è proceduto alla pianificazione delle attività secondo il cronoprogramma di progetto.

Durante questa fase si è provveduto anche a effettuare un inventario iniziale dei materiali necessari alla messa a punto della sperimentazione, sia per la Fase 1 che per la Fase 2. A tal proposito sono stati individuati i fornitori ed è stato raccolto il materiale utile all'avvio dell'attività di sperimentazione.

2.1.2 Allestimento collettori larve e posizionamento in mare

Tale azione corrisponde all'**Attività 1.1** presentata in Tab. 1.a.

In una prima fase si è proceduto alla progettazione e realizzazione di un telaio con funzione di supporto dei collettori da immergere nel I seno del Mar Piccolo. Il telaio progettato presenta una forma cubica con lato 2,5 m ed è realizzato in acciaio inox (Fig. 2.1.2.A).

Contemporaneamente sono stati ideati e realizzati i collettori atti alla captazione delle larve di ostrica piatta, sulla base anche della letteratura citata in bibliografia. Per la captazione delle larve di ostrica piatta la sperimentazione ha previsto l'impiego di due tipologie di collettori denominati "collettori a gusci" (Figg. 2.1.2.B) e "collettori a reggette" (Figg. 2.1.2.C a÷b).

I collettori a gusci sono stati realizzati introducendo in una retina per mitilicoltura (maglie da 1,5 cm) lunga circa 2,5 m, circa 600 gusci di *Mytilus galloprovincialis* (cozza). Sono state realizzate in questo modo 20 reste per un totale di 12000 gusci. In particolare, il reperimento di questo materiale è avvenuto grazie alla collaborazione di numerosi rivenditori locali (Taranto) che provvedono alla sgusciatura dei mitili destinati al commercio al dettaglio. Le valve sono state dunque stoccate in cassette di plastica per facilitare l'essiccazione e la successiva rimozione di residui organici (Fig. 2.1.2.B).

I collettori a reggette sono stati realizzati adoperando reggette in propilene da 12 mm x 0,6 mm di colore nero (per mitigare la proliferazione algale e rendere più visibili le larve) per realizzare dei



“focchi” di circa 3 m ciascuno con anse di misura variabile dai 40 ai 15 cm. Tali focchi sono stati collocati ad una distanza compresa tra i 30 cm ed i 40 cm su una fune di canapa (di diametro 20 mm) lunga 3,5 m attraverso fascette per cablaggio e spago da 1,5 mm, per un totale di 7 focchi per collettore. In totale sono stati realizzati 20 collettori a reggette (Fig. 2.1.2.C *a÷b*).

In seguito, le due tipologie di captatori sono state assicurate al telaio di supporto. Su due dei quattro lati sono stati disposti i captatori a gusci e sugli altri due lati quelli a reggette. Entrambi sono stati saldamente ancorati al telaio sia nella parte superiore che in quella inferiore.

Una volta conclusa la fase di allestimento della struttura, si è provveduto a calare in mare l’impianto nel sito preposto con l’ausilio di una motopesca provvisto di verricello idraulico. La struttura è stata opportunamente provvista di ormeggi e boe galleggianti. I riproduttori sono stati inseriti al centro della struttura all’interno di contenitori che, come già dimostrato in letteratura, risultano essere idonei all’allevamento della ostrica piatta. Tali contenitori, detti “lanternet”, sono realizzati in corda e sono costituiti da camere di allevamento sovrapposte, ognuna dotata di accesso (Fig. 2.1.2.D).



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.1.2.A – Telaio con funzione di supporto dei riproduttori.



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

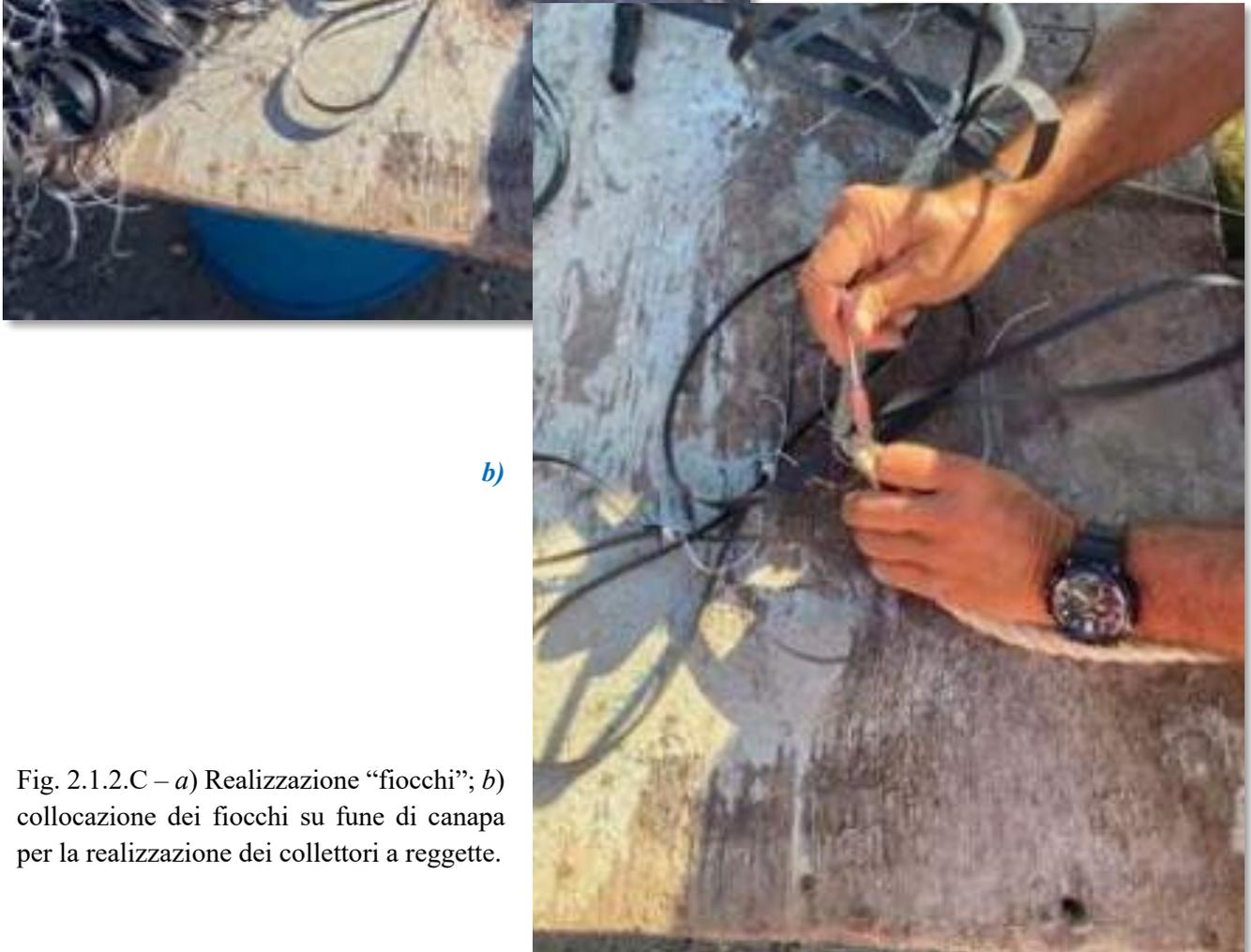
PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.1.2.B – Collettore a gusci.



a)



b)

Fig. 2.1.2.C – a) Realizzazione “focchi”; b) collocazione dei focchi su fune di canapa per la realizzazione dei collettori a reggette.



Fig. 2.1.2.D – Esempio di lanternet.

2.1.3 Monitoraggio dell'impianto e dei riproduttori

Tale azione corrisponde all'**Attività 1.1** presentata in Tab. 1.a. Come riportato nel paragrafo “Descrizione tecnica dettagliata dei lavori e degli investimenti proposti” della Nota esplicativa della descrizione del progetto, in seguito alla collocazione *in situ* della struttura deputata alla sperimentazione, è stato condotto un monitoraggio a cadenza mensile dell'impianto e delle condizioni dei riproduttori. Tale monitoraggio è stato svolto in accordo con quanto pianificato per la Fase 1 ed ha avuto luogo mensilmente a partire dal mese di agosto 2022 fino al mese di novembre 2023. In particolare, sono state condotte azioni volte a:



- i. monitorare in immersione lo stato di salute dei riproduttori nel lanternet mediante misurazioni biometriche delle valve e osservazioni dell'eventuale apertura delle stesse (indice di pessimo stato di salute, fino anche alla morte dell'esemplare) (Figg. 2.1.3.A $a \div b$);
- ii. salpare i lanternet che ospitano i riproduttori per assicurare la loro manutenzione ed effettuare la rimozione dagli organismi epibionti che colonizzano le maglie della rete, impedendo un'efficace circolazione dell'acqua (Figg. 2.1.3.A $b \div c$);
- iii. monitorare in immersione l'eventuale insediamento di larve presso i collettori dell'impianto di captazione (Fig. 2.1.3.B $a \div b$); iv) controllare l'integrità del telaio immerso e di tutta la struttura di sperimentazione (ormeggi e boe galleggianti) (Fig. 2.1.3.B c). Le attività svolte in immersione sono state documentate attraverso video subacquei, dai quali sono tratte le immagini utilizzate in questa relazione.

In aggiunta alla raccolta dei dati biometrici e dello stato di integrità dell'impianto sperimentale, sono stati monitorati i principali parametri chimico/fisici delle acque di allevamento. Per tale scopo è stata adoperata da imbarcazione una sonda multiparametrica CTD *Idronaut Ocean Seven 310 Plus* provvista di sensori per la misura di Pressione, Temperatura, Conduttività, Ossigeno disciolto, pH, Potenziale redox, Torbidità, Clorofilla *a* (Fig. 2.1.3.C). Le misurazioni sono state effettuate lungo tutta la colonna d'acqua, con registrazione ogni 10 cm in *downcast* (dalla superficie sino in prossimità del fondo). Le profondità vengono desunte dal sensore di pressione secondo la conversione diretta dBar-metri. Le misurazioni sono state effettuate in "libera" (Fig. 2.1.3.D).

Nel corso del monitoraggio è avvenuta l'immersione di un secondo lotto di riproduttori presso l'impianto. Inoltre, dal momento che il periodo di emissione delle larve, sulla base di quanto riportato in letteratura, inizia quando la temperatura dell'acqua raggiunge i 17°C, la ricerca delle larve sui collettori è avvenuta con maggiore intensità a partire dalla prima registrazione di tale valore nelle acque di allevamento.



a)

b)



c)

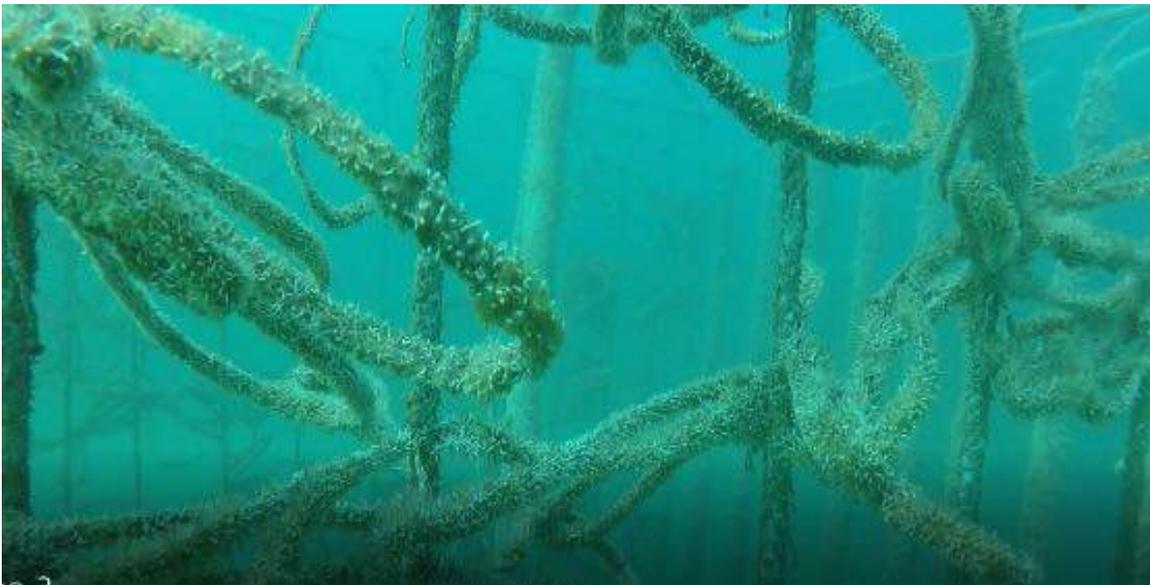


Fig. 2.1.3.A – a) Riproduttori vivi nel lanternet; b) monitoraggio dello stato di salute dei riproduttori ospitati nel lanternet e osservazioni dell'eventuale apertura delle valve; c) rimozione dagli organismi epibionti che colonizzano le maglie della rete.



DIPARTIMENTO DI BIOSCENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



a)



b)



c)

Fig. 2.1.3.B – *a)* Monitoraggio in immersione dei collettori a reggette dell'impianto di captazione; *b)* monitoraggio in immersione dei collettori a gusci dell'impianto di captazione; *c)* controllo dell'integrità del telaio immerso.



Fig. 2.1.3.C – Sonda Multiparametrica CTD *Idronaut Ocean Seven 310 Plus* e turbidimetro.

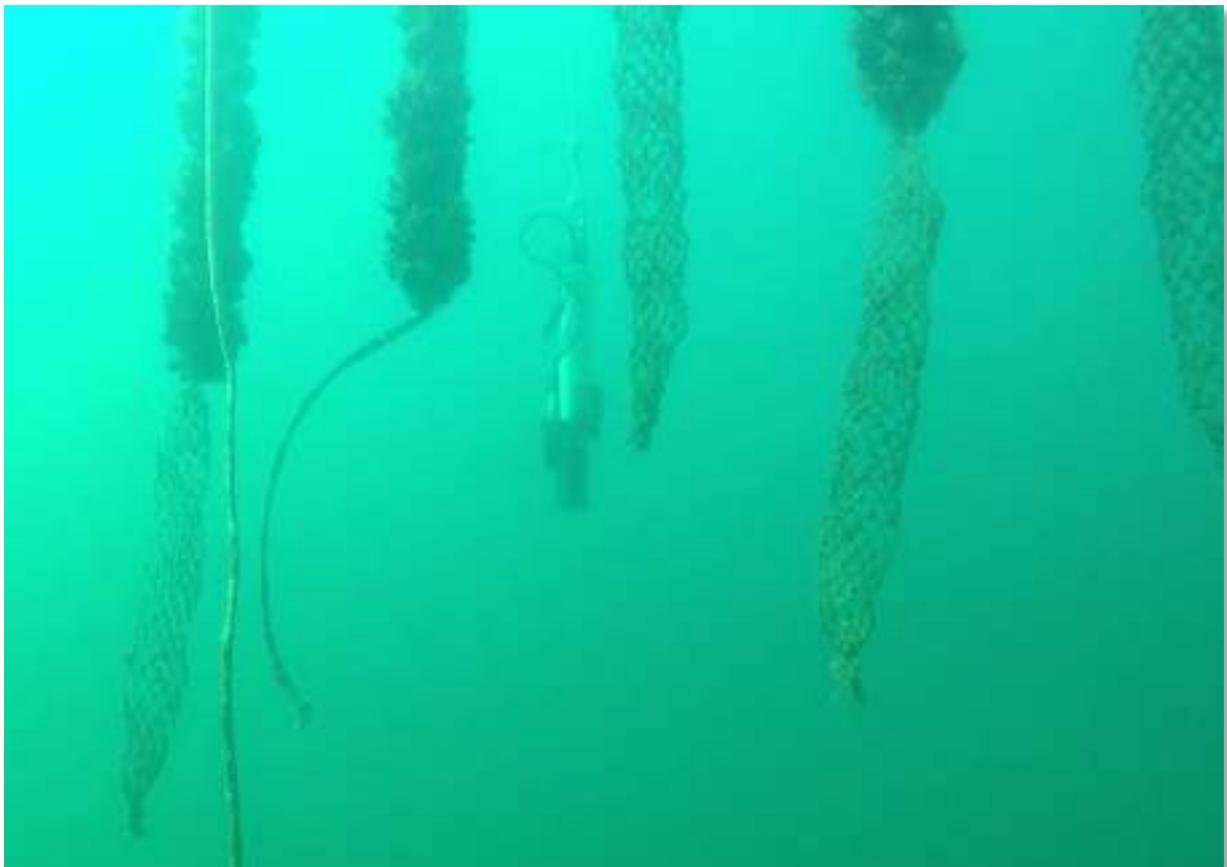


Fig. 2.1.3.D – Misura di parametri chimico-fisici con sonda multiparametrica e turbidimetro durante il monitoraggio.

2.1.4 Monitoraggio dell'insediamento di larve presso i collettori

Tale azione corrisponde alle **Attività 1.3** e **1.5** presentate in Tab. 1.a.

A partire dal mese di aprile 2023 sono cominciate le operazioni di ricerca delle larve presso i collettori. Per il primo controllo, si è proceduto al prelievo di due collettori mediante l'impiego di operatore subacqueo, rispettivamente uno relativo alle reggette e l'altro relativo ai gusci di mitili (Figg. 2.1.4.A *a÷b*).

Entrambi i collettori (reggette e gusci) hanno presentato una ricca colonizzazione di organismi epibionti costituiti dai principali *taxa* presenti in Mar Piccolo e caratteristici del benthos autoctono, quali ascidiacei, briozoi, tunicati, riccamente colonizzati da piccoli crostacei appartenenti ai gruppi di *Maxillopoda* (cirripedi e copepodi), *Malacostraca* (misidiacei ed isopodi).

Si è proceduto quindi ad analizzare i collettori onde ricercare le piccole ostriche insediate su di essi (Figg. 2.1.4.B *a÷c*). In tale fase, tutti gli individui insediati sono stati isolati, contati e ricollocati all'interno dei lanternet (Fig. 2.1.4.C). Al termine di questa operazione, ogni lanternet è stato posizionato in mare al fine di poter valutare il tasso di sopravvivenza nei mesi successivi. Una volta esaminati tutti i collettori, alcune giornate di lavoro sono state dedicate al recupero della struttura metallica su cui erano fissati (Fig. 2.1.4.D) ed alla rimozione di tutto il materiale sperimentale che non era stato raccolto, come ad esempio i frammenti di collettori a reggette danneggiati.

Contemporaneamente, i lanternet contenenti gli individui insediati sono stati periodicamente salpati a terra e sostituiti allo scopo di ridurre la quantità di *fouling* che impedirebbe un'efficace circolazione dell'acqua (Fig. 2.1.4.E).

Infine, i parametri chimico/fisici della colonna d'acqua stati monitorati con la sonda multiparametrica CTD *Idronaut Ocean Seven 310 Plus* precedentemente descritta fino al termine della sperimentazione.



Fig. 2.1.4.A – Primo prelievo dei collettori. a) A sinistra il collettore a gusci, a destra il collettore a reggette; b) operazioni di mondatura di un collettore a gusci.



a)



b)



c)

Fig. 2.1.4.B – a) Guscio con l'insediamento di tre ostriche; b) Guscio con ostrica; c) Guscio con ostrica già in fase di crescita.



DIPARTIMENTO DI BIOSCENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.1.4.C – Ricollocazione degli individui insediati sui collettori all'interno dei lanternet.



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.1.4.D – Recupero della struttura metallica su cui erano fissati i collettori.



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.1.4.E – Salpa a terra dei lanternet per la loro sostituzione periodica.

2.2 FASE 2

La Fase 2 del progetto è stata condotta in un'area preposta presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari ed è stata focalizzata sulla messa in opera di un protocollo di allevamento e riproduzione indotta delle ostriche piatte mantenute in stabulazione in condizioni controllate presso un laboratorio adeguatamente predisposto, progettato con l'intento di gestire in maniera appropriata sia i riproduttori sia le larve in accrescimento. Nella fase preliminare, precedentemente descritta (§ 2.1.1) è stato stilato un inventario che includesse tutti i materiali necessari alla costruzione di un laboratorio mobile finalizzato all'allevamento dei riproduttori di ostrica piatta. Tuttavia, i tempi tecnici hanno reso indisponibile l'allestimento del laboratorio mobile nei primi mesi della sperimentazione, pertanto si è ovviato a tale rallentamento della sperimentazione realizzando un laboratorio provvisorio che accogliesse i riproduttori in attesa della messa in funzione del laboratorio mobile.

La sperimentazione in stabulario si è articolata nelle seguenti misure:

- i) allestimento dello stabulario provvisorio e della camera algale;
- ii) collocazione in vasca dei riproduttori, realizzazione dei collettori e messa in acqua degli stessi;
- iii) allestimento dello stabulario mobile;
- iv) monitoraggio costante dello stato di salute dei riproduttori, dei parametri chimico-fisici dell'acqua della vasca mediante rilevamenti mediante sonda multiparametrica;
- v) ricerca delle larve in acqua e sui collettori;
- vi) eventuale l'allevamento dei nuovi esemplari di ostriche che abbiano superato la fase larvale.

2.2.1 Allestimento laboratorio/stabulario per riproduzione controllata

Tale azione corrisponde all'**Attività 1.2** presentata in **Tabella 1.A**.

La vasca utilizzata per la stabulazione dei riproduttori di ostrica piatta ha forma circolare con diametro di 2,5 m a fondo conico e volume complessivo di circa 2 m³, ed è riempita solo per il 50% al fine di mantenere un battente di circa 30 cm al fine di garantire una migliore circolazione dell'ossigeno ai riproduttori posizionati sul fondo (Figg. 2.2.1.A a÷b).

La vasca è dotata di un sistema di aerazione in rete, dotato di due tubi diffusori in grado di mantenere in agitazione costante l'intero volume della vasca (Figg. 2.2.1.A a÷b) ed una pompa esterna di filtraggio/ricircolo, della portata di circa 0,5 l/secondo al fine di migliorare l'assetto idrologico complessivo del volume d'acqua della vasca (Figg. 2.2.1.A a÷b).



La vasca è stata riempita con acqua potabile proveniente dalla rete idrica ed addizionata con sale marino (Red Sea coral pro salt) in sacchi da 25 kg cad. In particolare, il sale in questione presenta caratteristiche specifiche per uso in acquacoltura essendo bilanciato nella sua composizione ed addizionato con oligoelementi necessari ed indispensabili alla crescita degli organismi animali e vegetali. L'aggiunta del sale si è articolata attraverso operazioni successive di diluizione, sino al raggiungimento di un valore pari al 34-35‰ (35 g/l), considerata la salinità ottimale per i riproduttori di ostriche.

In seguito, al fine di fornire una illuminazione fitostimolante per produrre il fitoplancton necessario all'alimentazione dei riproduttori e delle larve, si è proceduto a predisporre un impianto di illuminazione della vasca attraverso l'impiego di strisce LED della intensità di 6000 K (Fig. 2.2.1.B). In una prima fase, in attesa che il laboratorio mobile fosse allestito e portato a piena efficienza, è stata attivata una camera algale provvisoria costituita da due boccioni in plastica PET (polietilentereftalato), ognuno della capacità di 18 l (normalmente utilizzati come contenitori di acqua potabile) in cui sono stati travasati volumi contenenti le alghe già ottenute da un laboratorio per la riproduzione dei molluschi sito in Taranto. Ogni boccione è stato provvisto di un sistema di illuminazione a LED della intensità di 6000 K e di un aeratore per mantenere in continua agitazione la coltura (Fig. 2.2.1.C÷D). Tali ceppi algali sono stati inoculati nella camera algale del laboratorio mobile non appena è terminata la fase di installazione dell'attrezzatura (Fig. 2.2.1.C). Le camere algali sono state così strutturate al fine di far crescere le alghe del genere *Thalassiosira* (Diatomophyceae) con dimensioni medie di 12 µm ed Haptophyceae con dimensioni comprese tra 2 e 4 µm, necessarie all'alimentazione dei riproduttori. In particolare, la scelta di adoperare una dieta multi-specifica è stata intrapresa al fine di evitare carenze sulla composizione dei lipidi necessari per una nutrizione corretta delle ostriche in ambiente controllato. A tal proposito, le microalghe adoperate come fonte alimentare sono di rilevante interesse per la loro capacità di sintetizzare acido docosoesanoico (DHA), acido eicosopentanoico (EPA) e acido arachidonico (ARA). Questi tre acidi, ad alto valore nutritivo, vengono accumulati soprattutto nelle membrane delle cellule del sistema immunitario delle ostriche, la cui composizione e funzione è fortemente influenzata dalla loro presenza (Delaporte et al., 2003). In particolare, le microalghe della specie *Isochrysis galbana* risultano avere una moderata percentuale di EPA ma una ricca percentuale di DHA, mentre le altre specie adoperate (es. *Thalassiosira* sp.), risultano ricche in EPA e povere in DHA.

Infine, le condizioni chimico-fisiche della vasca di stabulazione sono state monitorate con la medesima sonda CTD descritta nel paragrafo 2.1.3 (Fig. 2.2.1.D).



a)



b)

Fig. 2.2.1.A – a) Vasca di stabulazione dotata di sistema di aerazione in rete e di pompa esterna di filtraggio/ricircolo; b) Impianto di illuminazione della vasca di stabulazione, costituito da strisce LED di intensità di 6000 K.



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.2.1.B – Allestimento della camera algale provvisoria.



DIPARTIMENTO DI BIOSCENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.2.1.C – Allestimento della camera algale del laboratorio mobile.



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
Fondo Europeo per gli
Affari Marittimi e la Pesca



UNIVERSITÀ
Della SICILIA DI BASILICATA
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.2.1.D – Misura di parametri chimico-fisici con sonda multiparametrica e turbidimetro della vasca di stabulazione.

2.2.2 Stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate

Tale azione corrisponde all'Attività 1.4 presentata in Tab. 1.a.

Una volta che è stato appurato e verificato con opportune misurazioni lo stato di idoneità per l'allevamento dei riproduttori delle vasche di stabulazione, è stato possibile procedere con la collocazione delle ostriche adulte in vasca. Per svolgere questa azione sono state utilizzate 6 cassette di plastica alle cui maniglie è stato legato un cordino al cui centro è stato fissato un galleggiante che facilitasse sia la messa in acqua delle cassette che il successivo recupero o eventuale spostamento. In totale sono stati allocati in stabulazione 32 riproduttori (Fig. 2.2.2.A a). Prima dell'allocazione dei riproduttori, è stata aggiunta la soluzione con alghe *Isochrysis galbana* e del genere *Thalassiosira*, allevate nella camera algale precedentemente descritta. Successivamente si è proceduto al reperimento di tegole in terracotta con funzione di collettori di larve in vasca (Fig. 2.2.2.A b). In particolare, sono state utilizzate dieci tegole opportunamente ancorate al bordo della vasca, al fine di poterle salpare ed ispezionarne la superficie per l'individuazione delle larve. Tale pratica è ampiamente diffusa negli allevamenti francesi per l'insediamento delle larve.

Lo stato di salute delle ostriche nella vasca di allevamento, i parametri fisico-chimici dell'acqua con particolare attenzione alla salinità e alla torbidità e lo stato di accrescimento delle alghe nelle camere algali, sono state monitorate settimanalmente. I parametri fisico-chimici dell'acqua della vasca sono stati misurati mediante sonda multiparametrica descritta nel paragrafo 2.1.3 (Fig. 2.2.2.A c). Infine, in presenza di eccessiva crescita algale, si è provveduto (come da protocollo) ad effettuare una diluizione, rimuovendo parte del liquido di accrescimento con le alghe dalla camera algale da diluire e aggiungendo poi acqua di mare.



a)

b)



c)



Fig. 2.2.2.A – a) Cassette per l'ubicazione in vasca dei 32 riproduttori; b) Collocazione dei collettori in corrispondenza dei bordi della vasca di stabulazione; c) Impiego della sonda multiparametrica CTD per il monitoraggio delle acque della vasca di stabulazione.

2.2.3 Allestimento e manutenzione del laboratorio mobile e stabulazione dei riproduttori in condizioni controllate

Tale azione corrisponde all'Attività 1.4 presentata in Tab. 1.a.

Nei primi giorni del mese di marzo è iniziato l'allestimento della stazione mobile per allevamento delle ostriche e accrescimento delle larve in schiuditoi ed il settaggio di tutti i parametri del laboratorio in tutte le sue componenti (Figg. 2.2.3.A÷B a÷d). Tale stazione mobile si compone di una vasca di compensazione (Fig. 2.2.3.B a), di un filtro meccanico e biologico "a sabbia" dotato di termostato per la regolazione della temperatura e di lampada UV per l'abbattimento della carica microbiologica delle acque di allevamento (Fig. 2.2.3.B b), di sei vasche di allevamento circolari per la captazione delle larve (Fig. 2.2.3.B c) e dodici acquari per l'allevamento dei riproduttori (Fig. 2.2.3.B d). Anche in questo caso le vasche sono state riempite con acqua potabile proveniente dalla rete idrica ed addizionata con sale marino (Red Sea coral pro salt), sino al raggiungimento di un valore pari al 34-35‰ (35 g/l).

La vasca di compensazione (Fig. 2.2.3.B a) della capacità circa 1000 l rappresenta un sistema idraulico a cui affluiscono tutti gli scarichi derivanti dalle altre vasche per poi essere rilanciati di nuovo in circolo da una pompa premente. Essa è dotata di un interruttore galleggiante di arresto di emergenza che spegne automaticamente la pompa in caso di basso livello. Inoltre, un galleggiante blocca il circuito di afflusso dell'acqua marina (se presente) una volta raggiunto il battente previsto. Tale vasca è di estrema utilità, soprattutto, nella fase di costituzione dell'acqua di mare sintetica poiché il sale viene miscelato direttamente in essa ove l'acqua è tenuta in costante agitazione dall'afflusso di aria a mezzo pietra porosa, favorendone la dissoluzione.

I debatterizzatori UV SERIE LCD (Fig. 2.2.3.B b) sono stati progettati appositamente per distruggere i batteri patogeni ed i virus presenti nell'acqua attraverso l'emissione di radiazione ultravioletta (raggi UV-C, $\lambda = 254$ nm) che interagisce, a livello molecolare, con il DNA e l'RNA. Il profondo disordine bio-strutturale indotto da tale radiazione interferisce con lo sviluppo e la capacità di riproduzione di ogni tipo di microorganismo rendendolo inoffensivo.

Le vasche circolari tronco-coniche (Fig. 2.2.3.B c) presentano un profilo cilindrico con la estremità inferiore che termina a forma di cono. Sono comunemente utilizzate per l'allevamento nella prima fase larvale poiché possono essere dotate allo scarico (in superficie) di idoneo filtro per fermare le larve. In basso, il cono inferiore è dotato di valvola di scarico al fine di separare eventuali materiali che, sedimentando, dovessero depositarsi. L'alimentazione dell'acqua è garantita da un circuito

dotato di valvola di regolazione della portata ed inoltre è presente il sistema di insufflazione di aria mediante pietra porosa.

Infine, un quadro sinottico dell'impianto è riportato in Fig. 2.2.3.A.

La realizzazione del laboratorio mobile in container per la riproduzione artificiale delle ostriche ha richiesto un continuo e costante controllo del suo esercizio al fine di ottimizzare i parametri chimico-fisici dell'acqua e le portate differenziali alle vasche. L'avvio degli impianti e delle tecnologie per il trattamento dell'acqua ha richiesto un continuo monitoraggio dei parametri chimico-fisici della stessa con particolare riferimento alla salinità, soggetta a variazioni sia per la costante evaporazione sia per alcuni episodi di tracimazione dovuti al sistema di filtrazione delle larve "a tamburello" (Fig. 2.2.3.C *a*) la cui maglia (50 μm) si è rivelata troppo soggetta a fenomeni di intasamento che hanno provocato, in più di una occasione, la tracimazione dell'acqua dalla vasca troncoconica. Tale "incidente" ha comportato il reintegro del volume disperso con la connessa costituzione di acqua di mare sintetica con salinità al 35 ‰. Qui di seguito la documentazione fotografica inerente al fenomeno descritto. A tale scopo il sistema "a tamburello" è stato sostituito con dei setacci provvisti di maglia sino a 90 μm (Fig. 2.2.3.C *b*), immersi direttamente sulla superficie della vasca, per una profondità di 25 cm, lasciando così libero il deflusso dello scarico della vasca.

L'intensa illuminazione del laboratorio mobile ha favorito una notevole proliferazione algale. In alcuni casi tale proliferazione è risultata eccessiva, andando a ricoprire le pareti delle vasche e le valve delle ostriche stabulate, costituendo una patina algale filamentosa che è stato necessario rimuovere. Pertanto, si è proceduto alla regolare pulizia degli esemplari di ostriche, della conchiglia ed alla pulizia delle vasche in vetro mediante spazzolamento (Fig. 2.2.3.D *a÷d*).

Durante la fase di alimentazione, sia la filtrazione sia la sterilizzazione venivano sospese onde evitare il trattenimento delle cellule algali nel filtro (capacità filtrante sino a 5 micron) nonché il danneggiamento delle cellule e delle larve attraverso l'impiego dei raggi UV.

Al termine della sperimentazione, al fine di poter reimpiegare i medesimi riproduttori per ulteriori studi, gli stessi sono stati raccolti e reintrodotti in Mar Piccolo (Fig. 2.2.3.E).



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023

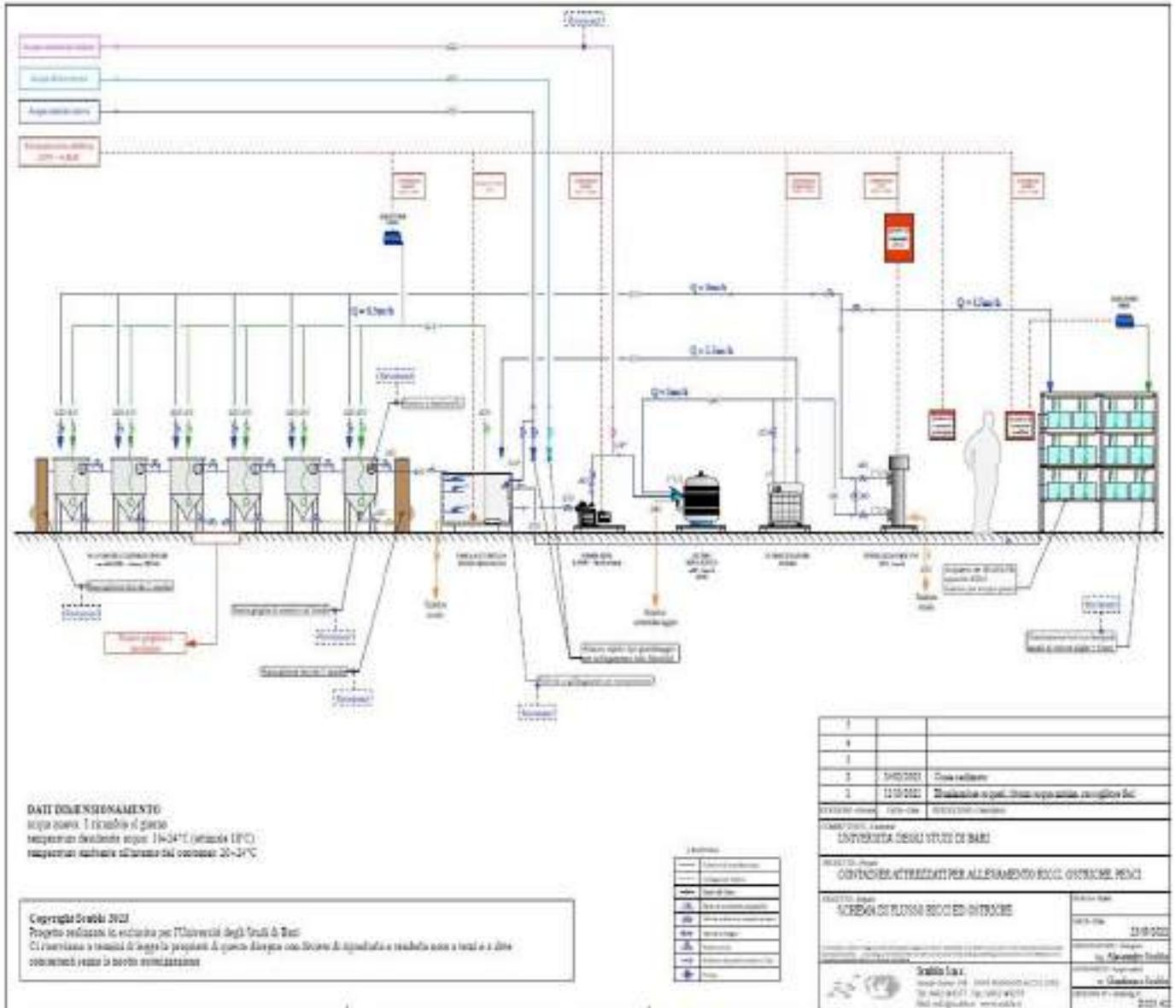


Fig. 2.2.3.A – Quadro sinottico dell'impianto.



Fig. 2.2.3.B – Allestimento della stazione mobile per allevamento delle ostriche e accrescimento delle larve. In particolare: a) Vasca di decantazione; b) Filtro meccanico e biologico “a sabbia” dotato di lampada UV e termostato; c) Vasche di allevamento; d) Acquari di allevamento.



a)



b)

Fig. 2.2.3.C – a) Filtro “a tamburello” intasato nella parte inferiore; b) Setaccio immerso in vasca.



a)

b)



c)

d)



Fig. 2.2.3.D – a) Spazzolamento dei gusci; b) Riproduttore spazzolato; c) Pulizia delle vasche in vetro; d) Vasche ripristinate.



DIPARTIMENTO DI BIOSCENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 2.2.3.E – Reintroduzione in Mar Piccolo degli individui riproduttori allevati in laboratorio.

2.2.4 Monitoraggio del successo riproduttivo in condizioni controllate e raccolta larve

A partire dal mese di giugno 2023 è cominciata la ricerca delle larve in ambiente controllato. La ricerca è avvenuta prelevando aliquote di acqua e materiale depositato sul fondo del setaccio posto proprio per l'intercettazione delle larve ed esaminando ogni aliquota immediatamente dopo il prelievo attraverso uno stereomicroscopio (Fig. 2.2.4.A).

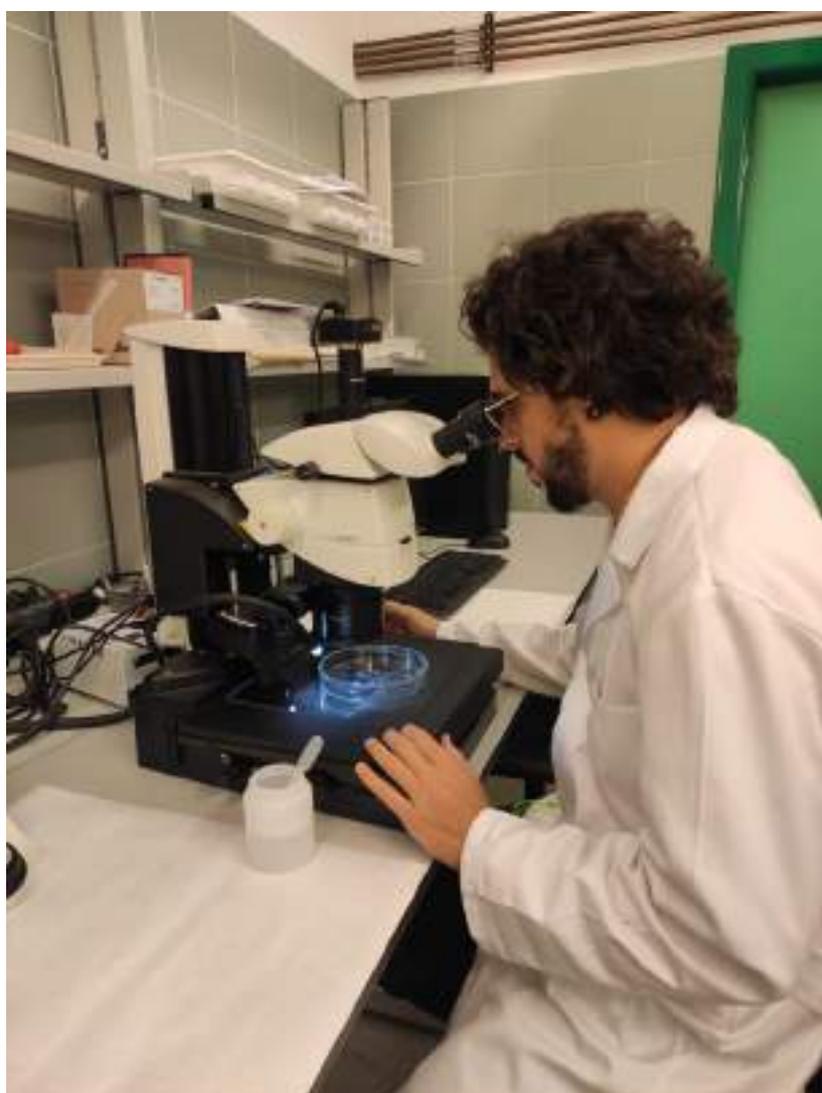


Fig. 2.2.4.A – Esame delle aliquote allo stereomicroscopio.

3 RISULTATI

Tale azione corrisponde all'Attività 1.6 presentata in Tab. 1.a.

3.1 PARAMETRI CHIMICO-FISICI RILEVATI DURANTE IL MONITORAGGIO DELL'IMPIANTO *IN SITU*

Il sito di allevamento posto nel I seno del Mar Piccolo di Taranto è collocato ad una profondità di circa 10 m. Le condizioni fisico-chimiche dell'acqua rilevate durante i mesi di monitoraggio sono riportate in Tab. 3.1.a. In particolare, durante il periodo di monitoraggio dei parametri, i valori medi di temperatura hanno oscillato tra 13,7 °C e 27,0 °C. Tali parametri sono stati registrati a febbraio 2023 ed a luglio 2023, rispettivamente. Infatti, i valori medi di temperatura più bassi sono stati registrati tra gennaio e febbraio 2023, mentre i valori medi più alti sono stati registrati tra luglio 2023 e settembre 2023. I valori medi di conducibilità rilevati sono compresi tra 43,5 mS/cm e 57,3 mS/cm. Tali valori sono stati registrati a febbraio 2023 e ad agosto 2023, rispettivamente. Il potenziale redox ha mostrato valori compresi tra 43,4 mV e 205,6 mV. Tali valori sono stati registrati ad ottobre 2022 ed a novembre 2023, rispettivamente. Il pH ha mostrato valori medi piuttosto stabili sia lungo la colonna d'acqua che durante tutto il periodo di studio, con valori compresi tra 8,0 e 8,3. La salinità ha mostrato valori medi piuttosto stabili sia lungo la colonna d'acqua che durante tutto il periodo di studio, con valori compresi tra 36,1 e 37,9 PSU. Tali valori sono stati registrati a luglio 2023 ed a settembre 2023, rispettivamente. L'ossigeno disciolto presenta valori medi di saturazione medi compresi tra 57,6% e 105,2%. Tali valori sono stati registrati ad agosto 2023 ed a giugno 2023, rispettivamente. Mentre i valori della concentrazione media di ossigeno disciolto sono compresa tra 5,1 ppm e 8,1 ppm. La Clorofilla a ha mostrato valori medi compresi tra 2,9 mg/m³ e 14,6 mg/m³. Tali valori sono stati registrati a settembre 2023 ed a gennaio 2023, rispettivamente. La torbidità ha mostrato valori medi compresi tra 0,2 FTU e 16,7 FTU. Tali valori sono stati registrati a ottobre 2023 ed a gennaio 2023, rispettivamente.



Tab. 3.1.a – Tabella riepilogativa dei parametri rilevati tramite sonda multiparametrica durante i singoli campionamenti mensili.

	Temperatura (°C)	Conducibilità (mS/cm)	Salinità (PSU)	O ₂ (%)	O ₂ (ppm)	pH	Eh (mV)	Clorofilla a (mg/m ³)	Torbidità (FTU)
Ottobre 2022									
Media	22.1	52.9	37.3	72.5	5.1	8.1	43.4	3.3	6.0
Sd	3.3	0.1	2.0	1.6	3.3	0.2	0.1	2.3	4.5
Mediana	22.1	53.4	37.7	77.3	5.4	8.2	47.7	3.3	5.1
Min	21.9	41.5	28.2	47.0	3.3	7.8	12.3	0.2	3.4
Max	22.4	55.2	38.8	82.5	5.8	8.2	64.0	8.9	31.1
Primo quartile	22.0	52.9	37.3	65.6	4.7	8.1	34.3	2.5	4.9
Terzo quartile	22.2	54.0	38.2	80.8	5.7	8.2	54.9	4.2	5.6
Novembre 2022									
Media	17.1	48.3	37.9	77.9	6.0	8.3	72.7	6.2	9.4
Sd	0.4	12.7	10.0	6.3	0.7	0.0	49.5	5.4	18.7
Mediana	16.9	47.7	37.7	78.8	6.1	8.3	72.7	4.5	6.2
Min	16.5	47.6	37.5	72.9	5.5	7.9	61.4	3.0	1.6
Max	17.8	49.9	38.7	83.3	7.7	8.3	99.9	86.4	87.8
Primo quartile	16.8	47.7	37.6	75.8	5.8	8.3	72.1	4.1	5.8
Terzo quartile	17.3	49.1	38.3	79.7	6.1	8.3	72.8	5.1	6.8
Gennaio 2023									
Media	13.8	43.8	37.0	85.7	7.1	8.3	54.4	14.6	16.7
Sd	0.7	2.3	1.8	9.1	0.8	0.4	6.4	15.1	27.8
Mediana	13.7	43.8	37.0	87.1	7.3	8.3	55.1	10.8	7.5
Min	13.1	41.7	34.3	64.1	5.2	8.2	10.0	2.9	7.3
Max	14.5	46.0	38.3	96.4	7.9	8.3	59.1	97.1	108.8
Primo quartile	13.6	43.1	36.4	84.0	6.9	8.3	53.0	3.5	7.4
Terzo quartile	14.0	44.6	37.6	91.6	7.5	8.3	57.1	21.5	7.7
Febbraio 2023									
Media	13.5	43.5	37.1	96.2	8.0	8.3	120.7	6.3	11.6
Sd	0.4	1.1	0.7	3.4	0.4	0.0	5.1	13.6	21.9
Mediana	13.7	43.3	36.9	95.2	7.9	8.2	121.4	2.6	5.1
Min	12.4	35.8	34.5	85.3	7.0	8.2	71.6	1.1	3.0
Max	13.9	45.5	38.5	102.6	9.9	8.4	127.2	97.3	110.0
Primo quartile	13.3	43.3	36.5	94.8	7.8	8.2	118.6	2.2	5.0
Terzo quartile	13.8	43.7	37.6	98.1	8.2	8.3	123.5	4.5	5.6
Marzo 2023									
Media	14.6	44.6	37.0	100.5	8.1	8.3	106.4	5.9	6.1
Sd	0.2	1.4	1.3	4.4	0.3	0.0	3.3	0.9	5.9
Mediana	14.5	44.7	36.9	100.5	8.1	8.3	106.8	5.8	6.1
Min	14.3	32.7	26.1	97.0	7.9	8.1	97.6	5.0	5.7
Max	14.8	46.3	38.5	106.3	9.2	8.3	113.7	8.4	12.5
Primo quartile	14.4	43.9	36.5	98.7	8.0	8.3	102.5	5.6	6.0
Terzo quartile	14.7	45.3	37.5	101.7	8.2	8.3	110.4	6.0	6.2
Aprile 2023									
Media	16.8	47.4	37.4	103.0	8.0	8.2	182.0	3.8	3.2
Sd	0.2	0.9	0.7	4.0	0.3	0.0	0.9	2.2	0.6
Mediana	16.7	47.7	37.5	101.6	7.9	8.2	182.0	3.3	3.1
Min	16.5	46.4	36.6	98.6	7.6	8.1	180.1	1.6	2.9
Max	17.1	48.6	38.7	110.0	8.5	8.3	183.8	8.9	7.4
Primo quartile	16.6	46.4	36.7	99.3	7.7	8.2	181.2	2.0	3.0
Terzo quartile	17.0	48.2	38.0	106.5	8.2	8.2	182.8	5.5	3.2



Maggio 2023

Media	22.5	53.2	37.2	57.6	4.0	8.2	117.5	6.5	4.4
Sd	0.7	0.8	0.9	7.9	0.6	0.0	0.8	2.6	1.4
Mediana	22.1	53.0	37.2	53.6	3.8	8.2	117.7	5.5	4.2
Min	21.8	51.9	35.7	50.3	3.4	8.1	116.2	2.8	3.3
Max	23.9	54.6	38.7	72.0	5.0	8.2	118.8	15.1	23.3
Primo quartile	21.9	52.6	36.4	51.2	3.6	8.2	116.8	4.6	4.1
Terzo quartile	22.7	53.8	37.9	64.2	4.5	8.2	118.1	8.2	4.3

Giugno 2023

Media	23.3	53.7	36.9	105.2	7.2	8.2	162.8	3.7	4.4
Sd	1.2	0.9	0.9	4.4	0.4	0.0	0.3	2.0	0.2
Mediana	22.9	53.9	36.8	105.1	7.3	8.2	162.9	2.8	4.4
Min	21.9	49.7	34.9	99.0	6.6	8.1	162.3	1.4	4.0
Max	25.7	54.9	38.5	116.3	8.2	8.2	163.4	8.9	5.1
Primo quartile	22.4	52.9	36.2	101.4	6.9	8.2	162.4	2.2	4.3
Terzo quartile	24.5	54.5	37.6	105.7	7.4	8.2	163.1	5.1	4.6

Luglio 2023

Media	27.0	56.7	36.1	85.7	5.5	8.0	63.7	11.5	1.7
Sd	1.0	3.3	2.1	20.9	1.3	0.1	2.6	7.4	0.3
Mediana	27.1	56.6	36.8	83.3	5.5	7.9	63.6	8.1	1.7
Min	25.5	44.3	28.1	26.8	1.9	7.7	40.9	4.0	0.6
Max	28.9	60.2	38.1	116.7	7.4	8.1	66.4	26.6	3.1
Primo quartile	26.2	56.2	35.7	70.6	4.6	7.9	62.7	5.4	1.6
Terzo quartile	27.1	58.4	37.0	105.1	6.8	8.0	65.3	17.0	1.8

Agosto 2023

Media	26.9	57.3	36.6	51.3	3.3	8.0	61.8	11.6	1.8
Sd	1.1	2.2	1.3	4.6	0.3	0.1	2.0	7.1	0.4
Mediana	25.4	45.0	28.6	40.9	2.8	7.8	56.9	5.1	1.4
Min	29.0	60.1	38.0	60.1	3.9	8.1	64.6	26.2	3.6
Max	26.7	57.0	36.9	49.0	3.2	8.0	62.2	7.8	1.7
Primo quartile	26.0	56.3	36.7	48.0	3.1	8.0	60.1	6.0	1.5
Terzo quartile	27.4	58.5	37.0	55.3	3.5	8.0	63.6	18.6	1.8

Settembre 2023

Media	25.1	57.1	37.9	72.5	4.8	8.0	100.6	2.9	2.8
Sd	0.1	0.7	0.5	0.6	0.0	0.0	1.6	1.1	8.0
Mediana	25.0	57.0	37.9	72.6	4.8	8.0	100.8	2.8	0.7
Min	24.9	53.9	35.6	69.7	4.6	7.9	92.0	0.8	0.2
Max	25.2	57.9	38.6	73.2	4.9	8.0	102.6	7.1	69.8
Primo quartile	25.0	56.9	37.8	72.6	4.8	8.0	99.7	2.3	0.4
Terzo quartile	25.1	57.4	38.1	72.7	4.8	8.0	101.8	3.3	2.3

Ottobre 2023

Media	16.4	46.9	37.3	89.8	7.0	8.1	200.0	3.7	0.2
Sd	0.3	0.8	0.5	2.8	0.2	0.0	0.2	0.9	0.3
Mediana	16.4	47.0	37.4	89.8	7.0	8.1	199.9	3.5	0.2
Min	15.8	45.4	36.5	86.0	6.7	8.1	199.6	2.2	0.0
Max	16.8	48.2	38.1	94.0	7.3	8.2	200.3	5.9	1.4
Primo quartile	16.4	46.6	37.0	86.8	6.9	8.1	199.9	3.0	0.1
Terzo quartile	16.5	47.2	37.6	92.6	7.2	8.2	200.2	4.3	0.2



Novembre 2023

Media	16.4	47.0	37.4	88.9	6.9	8.1	205.6	3.9	0.3
Sd	0.3	0.7	0.4	1.7	0.1	0.0	0.2	0.9	0.4
Mediana	16.4	47.1	37.5	88.4	6.9	8.1	205.6	3.8	0.1
Min	15.9	45.6	36.6	86.5	6.7	8.1	205.4	2.3	0.0
Max	16.8	48.2	38.1	91.6	7.1	8.2	206.5	6.4	1.4
Primo quartile	16.4	46.7	37.1	87.4	6.8	8.1	205.5	3.2	0.1
Terzo quartile	16.5	47.4	37.6	90.6	7.0	8.2	205.7	4.6	0.2

3.2 MONITORAGGIO DELL'INSEDIAMENTO DI LARVE PRESSO I COLLETTORI

La conta degli individui di ostrica piatta insediatisi con successo sui due tipi di collettori adoperati nella sperimentazione, mostra evidentemente un maggior successo di insediamento sui collettori a gusci rispetto a quelli a reggette, con valori medi di 115 ± 51 e di 24 ± 17 individui insediati, rispettivamente (Tab. 3.2.a).

Va evidenziato che durante la sperimentazione solo per 5 collettori non è stato possibile contare gli individui insediati, diversamente, 15 collettori a reggette sono risultati danneggiati e dunque per questi non è stato possibile effettuare la conta degli individui.

Durante la conta degli individui sopravvissuti all'interno dei lanternet, si nota come il tasso di individui sopravvissuti (calcolato come individui vivi/individui totali) fosse maggiore prima che la stagione estiva prendesse piede. Infatti, mentre all'inizio del mese di giugno il tasso di sopravvivenza era di 0,99, nel mese di novembre aveva un valore medio di 0,21 (Tab. 3.2.b).



Tab. 3.2.a – Conta individui insediati sui singoli collettori rimasti integri fino al momento della conta.

Collettore a reggette				Collettore a gusci			
ID	N. vivi	N. morti	Data	ID	N. vivi	N. morti	Data
1	37	0	27/04/2023	1	180	0	27/04/2023
2	46	3	09/06/2023	2	137	26	09/06/2023
3	10	2	09/06/2023	3	24	31	09/06/2023
4	20	13	09/06/2023	4	60	21	09/06/2023
5	6	2	09/06/2023	5	56	55	09/06/2023
6				6	99	28	23/06/2023
7				7	62	33	23/06/2023
8				8	209	49	23/06/2023
9				9	96	44	23/06/2023
10				10	133	42	23/06/2023
11				11	120	41	23/06/2023
12				12	105	27	23/06/2023
13				13	126	41	23/06/2023
14				14	153	61	23/06/2023
15				15	169	15	23/06/2023
16				16			
17				17			
18				18			
19				19			
20				20			
Tot.	119	20		Tot.	1729	514	
Media	23.8	4.0		Media	115.3	34.3	
Sd	17.2	5.1		Sd	51.2	15.8	

Tab. 3.2.b – Conta individui insediati all'interno dei lanternet.

ID Lanternet	N. vivi	N. morti	Tasso di sopravvivenza	Data
1	179	1	0.99	09/06/2023
1	110	172	0.39	15/11/2023
2	47	191	0.20	15/11/2023
3	21	147	0.13	15/11/2023
4	17	44	0.28	15/11/2023
5	42	136	0.24	15/11/2023
6	19	101	0.16	15/11/2023
7	8	116	0.06	15/11/2023

3.3 MONITORAGGIO DELLA RIPRODUZIONE IN AMBIENTE CONTROLLATO

Già al primo controllo è emersa la presenza di larve all'interno del setaccio (Fig. 3.3.A).

Purtroppo, al termine della sperimentazione non sono state trovate larve vitali all'interno del setaccio. Tuttavia, all'interno degli acquari sono cresciuti alcuni individui insediatisi sulle valve dei riproduttori (Fig. 3.3.B). Si rimanda al Capitolo 4 per le considerazioni finali riguardanti la sperimentazione.

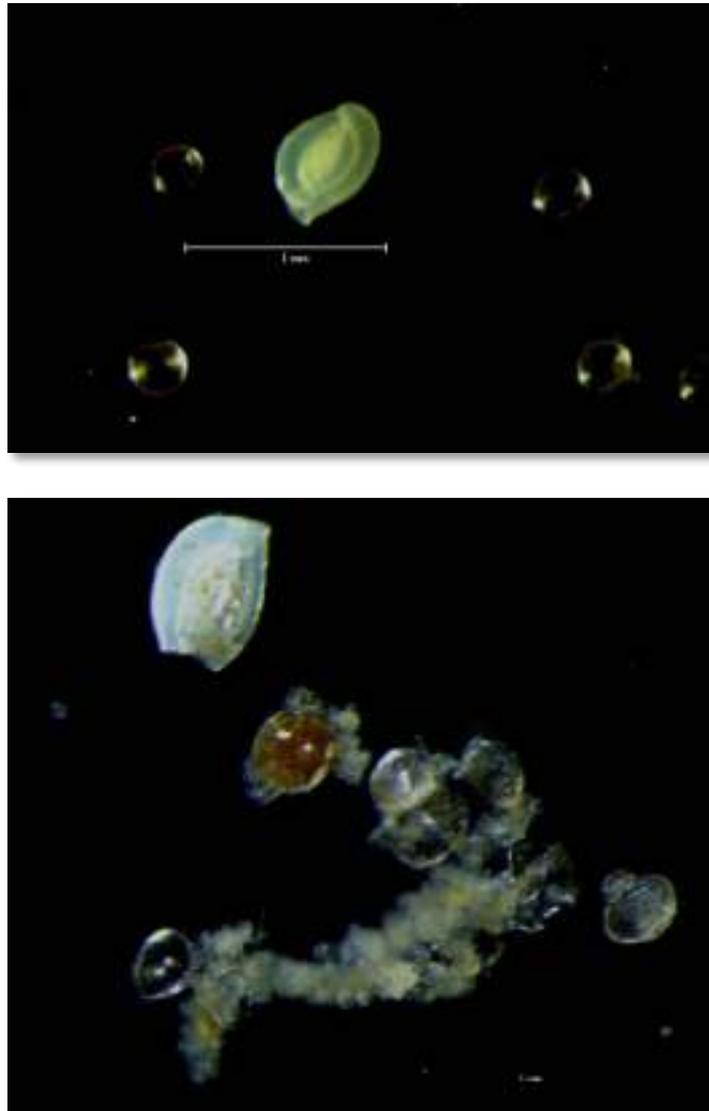


Fig. 3.3.A – Larve di *Ostrea edulis* osservate allo stereomicroscopio.



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Fig. 3.3.B – Individuo insediato sulle valve dei riproduttori posti in ambiente controllato.

4 CONSIDERAZIONI FINALI

Le azioni svolte nella **Fase 1** e nella **Fase 2** dell’**“Attività 1: Recupero della coltura di specie autoctone con alto valore commerciale, come l’ostrica piatta (*Ostrea edulis*)”** all’interno del progetto **“Approcci innovativi per una acquacoltura integrata e sostenibile”** hanno permesso di raggiungere gli obiettivi previsti per questa fase di avanzamento. A tal riguardo, tutte le azioni previste nel progetto e riportate in Tab. 1.a, sono state condotte con successo. Durante il periodo di studio i riproduttori sono stati allevati con successo sia in ambiente marino (Mar Piccolo) che in ambiente controllato (all’interno del laboratorio mobile). Inoltre, in entrambi i casi la loro riproduzione è avvenuta con successo ed è stato possibile intercettare le larve prodotte.

Per quanto riguarda le azioni condotte in ambiente marino, il monitoraggio a cadenza mensile dell’impianto e della salute dei riproduttori *in situ* condotto in seguito alla collocazione della struttura deputata alla sperimentazione, ha consentito di:

- i) monitorare in immersione lo stato di salute dei riproduttori nel lanternet mediante misurazioni biometriche delle valve e osservazioni dell’eventuale apertura delle stesse (indice di pessimo stato di salute, fino anche a morte dell’esemplare);
- ii) salpare i lanternet che ospitano i riproduttori per assicurare la loro manutenzione ed effettuare la rimozione dagli organismi epibionti che colonizzano le maglie della rete, impedendo un’efficace circolazione dell’acqua;
- iii) monitorare in immersione l’eventuale insediamento di larve presso i collettori dell’impianto del laboratorio mobile;
- iv) controllare l’integrità del telaio immerso e di tutta la struttura di sperimentazione.

Infine, a partire dal mese di novembre 2022, i valori di temperatura rilevati hanno mostrato valori inferiori ai 17 °C, per cui il monitoraggio della presenza di larve sui captatori è stato concentrato nei mesi successivi. Non è stato possibile verificare se la riduzione del tasso di sopravvivenza fosse dovuta unicamente all’aumento della temperatura o ad altri fattori (es aumento della competizione spaziale con altri organismi del *fouling*); tuttavia queste informazioni sono in accordo con quanto osservato nella stessa area da Carlucci et al., (2010). Pertanto, si auspica di approfondire tale aspetto in future sperimentazioni. Infine, il numero di individui insediati sui collettori ed il loro tasso di sopravvivenza rappresentano un successo alla luce delle difficoltà sempre riscontrate per questa fase critica dell’allevamento dell’ostrica piatta. A tal proposito, questa sperimentazione rappresenta un



punto di partenza per ulteriori studi atti a confermare quanto osservato e diretti a comprendere quali siano i periodi migliori con in cui effettuare i passaggi-chiave di questa pratica (es. ricollocazione larve insediate, frequenza di pulizia dei lanternet, periodo di accrescimento, raccolta del prodotto per la commercializzazione). Questi risultati, se confermati incoraggerebbero, almeno per le acque del Mar Piccolo, una produzione condotta totalmente a mare. Tale possibilità andrebbe esaminata anche in un'ottica di sostenibilità economica.

Per quanto riguarda le azioni condotte presso il laboratorio mobile per la riproduzione artificiale di *O. edulis*, è stato condotto un controllo settimanale dello stato di salute delle ostriche nella vasca di allevamento, dei parametri fisico-chimici dell'acqua e dello stato di accrescimento delle alghe nelle camere algali. Tale sperimentazione ha rappresentato la possibilità di collaudare un impianto pilota ove cimentarsi con le numerose problematiche afferenti al tema della riproduzione dei molluschi. Durante la sperimentazione è emerso come il successo riproduttivo fosse significativamente condizionato dai parametri chimico/fisici dell'acqua di stabulazione (principalmente temperatura e salinità) nonché dalla disponibilità delle colture algali per l'alimentazione. Un ulteriore elemento di valutazione riguarda la disponibilità di acqua salata. Infatti, tale disponibilità ha spesso rappresentato un limite operativo dovuto da un lato al costo del sale da aggiungere all'acqua dolce disponibile presso il laboratorio, dall'altro lato alla elevata frequenza con cui questa operazione è stata effettuata.

Pertanto, la localizzazione di un laboratorio in prossimità del mare, ove sia possibile approvvigionarsi di acqua marina, potrebbe abbattere i costi di gestione di un impianto. Inoltre, tale possibilità consentirebbe di ridurre la variabilità delle caratteristiche fisico/chimiche dell'acqua (es. temperatura, salinità).

La metodologia adottata per l'alimentazione di larve e riproduttori in laboratorio è stata sufficiente a condurre la sperimentazione auspicata per tale progetto, confermando la sua strategicità per il successo riproduttivo in ambiente controllato. Diversamente, al fine di ottimizzare la somministrazione dell'alimento, risulta necessario implementare tale impianto con strumenti in grado di selezionare i ceppi algali, determinare una selezione nutrizionali e di un sistema analitico che permetta di misurare la concentrazione delle cellule algali in acqua.

L'impianto del laboratorio mobile ha mostrato alcuni limiti soprattutto in relazione alla possibilità di mantenere una idonea qualità dell'acqua oltre che la predisposizione ad eventi di trabocco dovuti all'ostruzione dei filtri posti per intercettare le larve di ostrica piatta. Si sottolinea dunque la necessità di sperimentare l'aggiunta di una seconda linea "aperta" per le vasche di stabulazione dei riproduttori con la quale veicolare l'alimentazione e di un impianto di scarico del "troppo pieno" al fine di evitare

allagamenti in caso di ostruzione dei filtri.

In conclusione, le azioni condotte, a fronte delle criticità già evidenziate, hanno registrato un successo riproduttivo a carattere sperimentale, permettendo di focalizzare ed ottimizzare le tecnologie ed i protocolli necessari per condurre le fasi di riproduzione dell'ostrica piatta, soprattutto, in relazione ai parametri chimico/fisici dell'acqua di stabulazione.

4.1 PROSPETTIVE PER IL RECUPERO DELLA COLTURA DI *O. EDULIS*

Per comprendere gli scenari possibili in cui può svilupparsi nel futuro la tecnologia della riproduzione artificiale nell'ambito della filiera della molluschicoltura, è necessario effettuare alcune considerazioni sul contesto, anche territoriale, in cui si esplica generalmente l'attività dello schiuditoio per molluschi.

L'attività di uno schiuditoio per molluschi è generalmente caratterizzata dalla produzione di milioni di pezzi. In particolare, le specie a cui numerosi schiuditoi si dedicano, riguardano essenzialmente due specie: la vongola verace (*Ruditapes philippinarum*, Adams & Reeve 1850) e l'ostrica concava (*Crassostrea gigas*, Thunberg, 1793). Tali "pezzi" (seme) vengono poi venduti a prezzi concorrenziali ed utilizzati come "seme" per vere e proprie coltivazioni in mare.

Anche a Taranto è presente uno schiuditoio per molluschi che opera su un mercato sia nazionale che internazionale essenzialmente nella produzione di seme di vongola verace in ragione di circa cento milioni di pezzi all'anno.

La recente crisi della vongolicoltura adriatica innescata dai significativi fenomeni di predazione da parte della specie aliena ed invasiva *Callinectes sapidus* (Rathbun 1896), detta granchio blu, ha avuto un immediato riflesso sugli schiuditoi che hanno dovuto sospendere la produzione, in attesa di nuovi ordini (Sabelli 2023). Proprio in quest'ottica diventa indispensabile rivalutare la possibilità di dedicare l'impegno dello schiuditoio verso nuove specie. In particolare, una specie che da sempre ha rappresentato l'emblema della molluschicoltura tarantina come l'ostrica piatta può rappresentare una valida alternativa.

In effetti, accidentalmente, nella ordinaria produzione di seme di vongola, già si registra la presenza di una piccola percentuale di esemplari di *Ostrea edulis* che vengono generalmente eliminati per non interferire con l'alimentazione del seme di vongola. Tali individui potrebbero essere coltivati su una linea parallela. Purtroppo, a differenza delle vongole, la cui semina avviene sui fondali sabbiosi, l'ostrica in questione va allevata in sospensione, utilizzando i comuni lanternet. Tale condizione,



rispetto alle vongole, rappresenta un limite significativo all'impiego del seme proveniente dallo schiuditoio poiché le quantità che si potrebbero produrre su scala zootecnica (milioni di pezzi) non troverebbero accoglienza negli impianti esistenti, la cui disponibilità in termini di attrezzature (lanternet) e specchi acquei, appare limitata in relazione alla elevata quantità di seme. Diversamente, ridurre la quantità prodotta a poche migliaia di pezzi, probabilmente non sarebbe sostenibile a livello economico, pur considerando che la resa in peso delle ostriche, a parità di numero di individui, è almeno dieci volte maggiore rispetto a quella delle vongole. Dunque, si conclude che sono necessari ulteriori studi per verificare non solo il risultato sperimentale ottenuto con la presente iniziativa ma anche verificare e definire un protocollo per la sostenibilità economica dell'attività.

Una prospettiva diversa si presenta a valle della sperimentazione condotta in mare con i collettori a gusci per la cattura delle larve di ostrica.

Diversi sono i vantaggi registrati:

- i) estrema efficienza riscontrata dai gusci di mitili nel fissare le larve di ostrica (anche 2/3 esemplari per guscio);
- ii) facile integrazione del metodo di captazione nella ordinaria attività di mitilicoltura quotidianamente svolta dagli operatori;
- iii) similarità di impianti ed attrezzature (tranne per i lanternet) con l'attività di mitilicoltura;
- iv) possibile contenimento dei costi per la riconversione e/o integrazione dell'attività di ostricoltura;
- v) la particolare condizione di qualità delle acque del I Seno del Mar Piccolo.

Infatti, come già confermato dalla storicità della coltivazione dell'ostrica piatta in tale area (Carlucci et al., 2008; 2010), qui, le acque risultano particolarmente vocate ad ospitarne l'allevamento rispetto al II seno, grazie al regime termico favorevole, alla maggiore profondità ed alla minore salinità dovute agli apporti di acqua dolce della sorgente Galeso. Diversamente, in altre aree dove la produzione di ostrica piatta è stata intentata, uno dei maggiori problemi è stata la difficoltà (o impossibilità) di identificare condizioni idrologiche ottimali per l'attecchimento e la successiva crescita degli animali in tempistiche economicamente sostenibili.

In conclusione, se tali condizioni fossero confermate da ulteriori sperimentazioni, sarebbe logico ritenere possibile la reintroduzione dell'allevamento dell'ostrica piatta, affrancandolo alla monocoltura dei mitili, senza la necessità di grandi investimenti. In aggiunta, tale recupero avrebbe la possibilità di conquistare una nicchia di mercato nazionale ed internazionale, che registra la cronica assenza di *Ostrea edulis*.

5 BIBLIOGRAFIA

- Airoldi, L., Beck, M.W., 2007. Loss, status and trends for coastal marine habitats of Europe. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 45, 345–405.
- Alabiso, G., Giacobini, M., Milillo, M., Ricci, P., 2005. The Taranto Sea system. 8 years of chemical–physical measurements. *Biol. Mar. Medit.* 12 (1), 369–373.
- Carlucci, R., Sassanelli, G., Mastrototaro, F., Imperatrice, M., Matarrese, A., (2008). Reproductive features of *Ostrea edulis* (L., 1758) (Bivalvia: Ostreacea) in the Mar Grande of Taranto (Northern Ionian Sea). 15. 230-231.
- Carlucci, R., Sassanelli, G., Matarrese, A., Giove, A., D’Onghia, G., (2010). Experimental data on growth, mortality and reproduction of *Ostrea edulis* (L., 1758) in a semi-enclosed basin of the Mediterranean Sea. *Aquaculture*. 306. 167-176. 10.1016/j.aquaculture.2010.05.026.
- Edwards, E., 2005. World shellfish production keeps growing. *Fish Farming Int.* 32 (1) 38 pp.
- FAO Fishery Statistic, 2006 <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquacultureproduction/en>
- Mirella da Silva, P., Fuentes, J., Villalba, A., 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Mar. Biol.* 147, 965–977.
- Narcisi, V., Arzul, I., Cargini, D., Mosca, F., Calzetta, A., Traversa, D., Robert, M., Joly, J.P., Chollet, B., Renault, T., Tiscar, P.G., 2010. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Organ.* 89 (1), 79–85.
- Panetta, P., Dell’Angelo, B., 1975. I citri del Mar Piccolo di Taranto. *Conchiglie* 11 (3–4), 65–86.
- Pastore, M., 1980. Riproduzione di *Mytilus galloprovincialis* LMK. e *Ostrea edulis* L. nei mari di Taranto: collettori usuali e collettori sperimentali per l’attecchimento delle larve. *Mem. Biol. Mar. Oceanogr.* (Suppl. X), 247–254.
- Sabelli, C., (2023). What scientists know about the blue crab invasion. *Nature Italy*. doi: <https://doi.org/10.1038/d43978-023-00123-7>
- Tieri, E., Cerchia, G., Cannone, G., Giansante, C., 2006. Presenza di *Marteilia refringens* in un banco naturale di ostriche piatte (*Ostrea edulis*) del Mare Adriatico Centrale in Italia. *Ittiopatologia* 3, 41–45.
- Tiscar, P.G., Quaglio, F., Della Salda, L., Cerchia, G., Delgado Montero, M.L., Restani, R., 2002. Presenza di *Bonamia ostreae* in ostriche piatte (*Ostrea edulis*) del Nord Adriatico. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica* 35, 2–10.



DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

Dipartimento di **Medicina Veterinaria**

PO FEAMP 2014/2020

Misura **2.47** - Innovazione art. **47** Reg. **508/2014**

Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20

APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE

ATTIVITÀ 2 Il riccio di mare



Per quanto riguarda il riccio di mare *Paracentrotus lividus*, il progetto ha avuto come obiettivo primario la progettazione e la realizzazione di un impianto sperimentale per la gestione del riccio di mare e del fitoplancton, in grado di supportare attività di riproduzione in cattività di questa specie con produzione di uova fecondate e di sviluppare attività di allevamento larvale fino alla forma giovanile bentonica.

In Italia la specie è solitamente oggetto di pesca ricreativa mentre risulta pescata professionalmente in alcune regioni del sud. Le gonadi hanno un alto valore commerciale sia consumate fresche sia lavorate per la conservazione, qualità che hanno determinato lo sfruttamento oramai insostenibile di questa specie. Nella Regione Puglia, a fronte di una domanda costante se non in aumento, la riduzione della popolazione ha causato un aumento delle importazioni e la perdita di redditività da parte dei pescatori, oltre che un aumento dei fenomeni di pesca e vendita abusiva e la perdita di biodiversità delle aree marine costiere.

La realizzazione di un prototipo innovativo per la gestione della riproduzione e dell'allevamento delle fasi giovanili del riccio di mare consentirà di implementare, in un prossimo futuro, un programma di ripopolamento sperimentale di esemplari giovanili bentonici lungo le coste pugliesi.

Le attività di progettazione sono partite subito dopo l'avvio ufficiale del progetto (21/03/2022) con l'analisi dei dispositivi da impiegare per la realizzazione di un prototipo per la gestione della riproduzione negli adulti e dell'allevamento larvale del riccio di mare *Paracentrotus lividus*, nonché per la produzione di fitoplancton destinato ad alimentare le larve nei diversi stadi di accrescimento, fino al raggiungimento della fase giovanile bentonica.

È stato così previsto l'allestimento di due box mobili (più un terzo in gestione al DipBio per le attività inerenti alle ostriche), uno per gestire in maniera appropriata sia i riproduttori sia la produzione di fitoplancton mentre l'altro è stato progettato per ospitare le larve in accrescimento. Il sistema a ricircolo d'acqua da allocare nel box che ospita le larve in accrescimento è stato progettato dedicando particolare attenzione ai flussi dinamici dell'acqua.

La ricerca dei fornitori con grande esperienza nella progettazione di impianti a ricircolo d'acqua marina per attività di acquacoltura ha permesso al gruppo di ricerca di individuare pochi attori del settore in grado di rispondere alle particolari esigenze connesse alla tipologia di impianto da allestire. In ogni caso, seguendo la procedura vigente in merito all'acquisizione di beni materiali da parte di una pubblica amministrazione, nel mese di giugno 2022 è stata pubblicata sulla piattaforma Mercati Elettronici della Pubblica Amministrazione (MEPA) la richiesta di offerta di preventivo per



l'approvvigionamento dei tre box da allestire e dell'attrezzatura da allestire nel box dedicato alle ostriche da parte del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie ed Ambiente (ex Dipartimento di Biologia), che aveva nel suo budget la disponibilità ad effettuare questo tipo di spesa. Al termine della procedura MEPA, la sola offerta ricevuta è stata quella della ditta SCUBLA srl che vanta una pluriennale esperienza nel settore dell'impiantistica per attività di acquacoltura sia a terra sia off-shore, oltre che garantire la piena disponibilità al supporto post-vendita.

L'impegno ad acquistare i tre box e l'attrezzatura da allocare nel box dedicato alle ostriche da parte del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie ed Ambiente ha permesso al Dipartimento di Medicina Veterinaria di bypassare le attese di una seconda richiesta di offerta da presentare sul MEPA, opzione prevista dal codice degli appalti, e quindi ha consentito di rivolgersi direttamente alla ditta SCUBLA srl in quanto assolutamente in grado di fornire un preventivo anche per l'allestimento degli altri due box (uno dedicato ai ricci di mare e l'altro dedicato alla produzione di fitoplancton). Sono stati condotti degli incontri presso la sede di SCUBLA al fine di progettare il migliore impianto possibile, cercando di assecondare le esigenze del progetto ma considerando anche la disponibilità economica prevista dal budget.

Qui di seguito si riporta il capitolato tecnico complessivo che è stato utilizzato per acquisire i preventivi per la stazione mobile:

Atto di Concessione_Prot_1096, Prospetto C n. 1, prototipo impianto per riproduttori di riccio di mare

N. 2 scaffale in alluminio con 12 acquari da 50 litri, completo di tubazioni e valvole per l'aerazione ed il ricircolo dell'acqua. La portata, la potenza in watt e le altre caratteristiche tecniche delle attrezzature elettriche devono essere commisurate al volume di acqua da gestire. Tutto deve essere allestito in uno dei tre box della stazione mobile. Trasporto franco Valenzano (BA).

Atto di Concessione_Prot_1096, Prospetto C n. 2, prototipo impianto allevamento larvale per ostrica e riccio di mare

N. 2 impianto di filtrazione a ricircolo completo di sump con filtro biologico, pompa di ricircolo, filtro meccanico a sabbia, sterilizzatore UV-c, climatizzatore con scambiatore in titanio, impianto elettrico per il comando di tutte le attrezzature, impianto idraulico per il ricircolo ed il bypass dell'acqua. La portata, la potenza in watt e le altre caratteristiche tecniche delle attrezzature elettriche

devono essere commisurate al volume di acqua da gestire. Tutto deve essere allestito in due dei tre box della stazione mobile. Trasporto franco Valenzano (BA).

Atto di Concessione_Proct_1096, Prospetto C n. 3, prototipo impianto allevamento larvale per ostrica e riccio di mare

N. 2 schiumatoio, pompa di risalita, lampada UV 36 watt, areatori 550 lt/h, 300 kg rocce sintetiche. La portata, la potenza in watt e le altre caratteristiche tecniche delle attrezzature elettriche devono essere commisurate al volume di acqua da gestire. Tutto deve essere allestito in due dei tre box della stazione mobile. Trasporto franco Valenzano (BA).

Atto di Concessione_Proct_1096, Prospetto C n. 4, prototipo impianto allevamento larvale per ostrica e riccio di mare

N. 1 impianti a ricircolo composto da n. 6 vasche cilindroconiche in vetroresina da 150 litri, n. 1 impianto di filtrazione a ricircolo completo di sump con filtro biologico, pompa di ricircolo, filtro meccanico a sabbia, sterilizzatore UV-c, climatizzatore con scambiatore in titanio, impianto elettrico per il comando di tutte le attrezzature, impianto idraulico per il ricircolo ed il bypass dell'acqua. Tutto deve essere allestito in due dei tre box della stazione mobile. Trasporto franco Valenzano (BA).

Atto di Concessione_Proct_1096, Prospetto C n. 5, prototipo impianto allevamento larvale per ostrica e riccio di mare

N. 4 mastelli tondi in pvc (per acqua marina) con manici da 100 lt ciascuno. Trasporto franco Valenzano (BA), scarico e posizionamento.

Atto di Concessione_Proct_1096, Prospetto C n. 6, prototipo impianto allevamento larvale per ostrica e riccio di mare

N. 4 cisterne in pvc (per acqua marina) da 1000 lt ciascuna. Trasporto franco Valenzano (BA), scarico e posizionamento.

Atto di Concessione_Proct_1096, Prospetto C n. 7, prototipo fotobioreattore

N. 1 struttura scaffale in alluminio per boccioni fitoplancton con 4 ripiani, illuminazione con lampade fotostimolanti, n. 24 contenitori in polycarbonato da 5,7 litri con coperchio. Struttura standard per 5 sacchi fitoplancton da 190 litri cadauno, composta da contenitori in rete metallica, illuminazione con



lampade fotostimolanti, aerazione. Lavatoio industriale a giorno, 1 vasca con un sgocciolatoio con dimensioni 1400 x 700 x 850h mm. Tavolo neutro con ripiano inferiore, piano inox ed alzatina posteriore con dimensioni 1800 x 700 x 850 h mm. Tutto deve essere incluso in uno dei tre box della stazione mobile. Trasporto franco Valenzano (BA).

Atto di Concessione_Prot_1096, Prospetto C n. 8, allestimento prototipo

Lavori inerenti il collegamento degli impianti prototipo all'interno dei prefabbricati, con fornitura e posa in opera di tubazioni, raccordi, valvole di intercettazione e quant'altro necessario per il funzionamento degli impianti. Collaudo di tutti gli impianti prototipo incluso.

Atto di Concessione_Prot_1096, Prospetto C n. 23, box da laboratorio

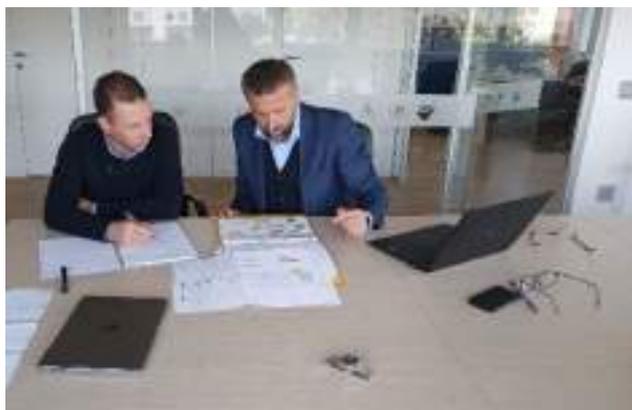
N. 3 prefabbricati in acciaio zincato e pannelli sandwich (isolamento 40 mm sulle pareti e 30 mm sulla copertura), dimensione del container 6x2,4x2,4 metri, portata 250 kg/m², con pavimento in pvc e spessore di 2 mm e piletta di scarico a pavimento, porta in alluminio cm 90x210 h, impianto elettrico e di illuminazione interno, impianto di climatizzazione dell'aria. Predisposizione esterna per allacciamento elettrico con presa industriale. Predisposizione esterna per allacciamento idraulico con manicotti filettati. Trasporto franco Valenzano (BA), scarico e posizionamento con gru dei prefabbricati già allestiti.

Atto di Concessione_Prot_1096, Prospetto C n. 24, prototipo impianto per riproduttori di ostriche

N. 1 Impianto a ricircolo composto da nr. 6 vasche cilindroconiche in vetroresina da 150 litri, nr. 1 impianto di filtrazione a ricircolo completo di sump da 100litri con filtro biologico a letto mobile avente media filtranti con superficie specifica 600m²/m³, pompa di ricircolo per acqua marina con portata 7.000 litri/ora, filtro meccanico a sabbia portata 6.000 litri/ora, sterilizzatore UV-C in polietilene da 40W e dosaggio 40mJ/cm², climatizzatore con scambiatore in titanio (potenza termica in raffreddamento 630W e in riscaldamento 400W), impianto elettrico per il comando di tutte le attrezzature, impianto idraulico per il ricircolo ed il bypass dell'acqua. La portata, la potenza in watt e le altre caratteristiche tecniche delle attrezzature elettriche devono essere commisurate al volume di acqua da gestire. Tutto deve essere allestito in uno dei tre box della stazione mobile. Trasporto franco Valenzano (BA).



Il gruppo di ricerca ha avviato una stretta collaborazione con l'azienda SCUBLA srl, aggiudicataria dell'allestimento dell'intera stazione mobile prevista per la gestione dei riproduttori e delle larve sia di riccio di mare sia di ostrica e per la gestione della produzione di fitoplancton, al fine di mantenere un costante confronto sulle opportunità e/o necessità relative alla progettazione e successiva realizzazione della stessa stazione mobile.



Incontro tecnico tra il prof. Centoducati e il titolare della ditta e visione della attrezzatura presso la sede di Scubla srl.

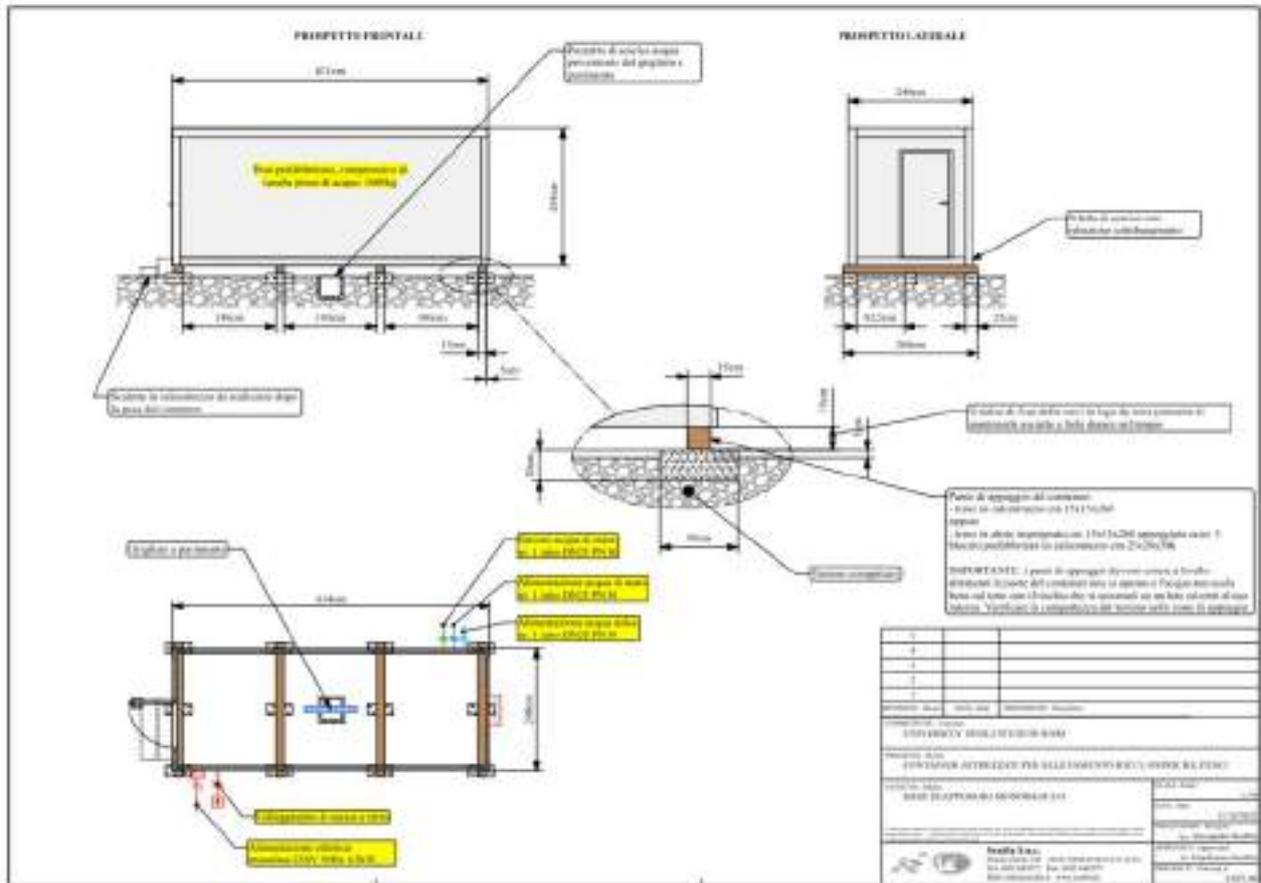
Nella fase di progettazione si è deciso di allestire un prototipo con specifiche caratteristiche tecniche identificate ad hoc per la specie del riccio di mare *Paracentrotus lividus*, che risulta molto sensibile alle variazioni di temperatura e salinità in ambienti confinati, oltre che al fotoperiodo e alla disponibilità e qualità di alimento. Il prototipo, inoltre, piuttosto che gestire di riproduttori, larve e giovanili con l'obiettivo di raggiungere esemplari di taglia commerciale (per ottenere gonadi mature) in condizioni controllate, è destinato alla produzione di giovanili bentonici in condizioni controllate a supporto dell'attuazione di possibili futuri programmi di ripopolamento del riccio di mare lungo le aree marino costiere.

Il prototipo è stato opportunamente progettato per ospitare tutti i dispositivi ed attrezzature e, soprattutto, con l'intento di gestire in maniera appropriata sia i riproduttori sia le larve in accrescimento, dedicando particolare attenzione ai flussi dinamici dell'acqua e al monitoraggio dei parametri chimico-fisici dell'acqua e garantendo il superamento del gap tecnologico che presentano gli attuali sistemi di riproduzione e allevamento presenti sul mercato.

Questi ultimi, infatti, devono necessariamente adeguarsi ad un più ampio range di caratteristiche tecniche per rispondere alle esigenze connesse con le diverse specie che è possibile gestire con questi impianti.

Il prototipo realizzato nell'ambito della presente proposta progettuale, disegnato specificamente per la gestione del riccio di mare *Paracentrotus lividus*, garantisce migliori tassi di sopravvivenza delle larve e dei giovanili, più alte percentuali di individui metamorfosati che assumono la forma bentonica, nonché tempi di accrescimento e qualità (benessere) degli individui allevati.

La progettazione del prototipo di stazione mobile prevede l'allestimento di n. 2 box, uno per la gestione degli adulti e delle larve di riccio di mare mentre l'altro per la produzione e gestione delle alghe unicellulari (fitoplancton) utilizzate come alimento da somministrare alle larve in fase di accrescimento. Inoltre, è presente un terzo box destinato alla gestione delle ostriche.



Box mobile con i dettagli relativi alle modalità di posizionamento presso gli spazi adibiti nel Campus Veterinario dell’Università degli Studi di Bari Aldo Moro.

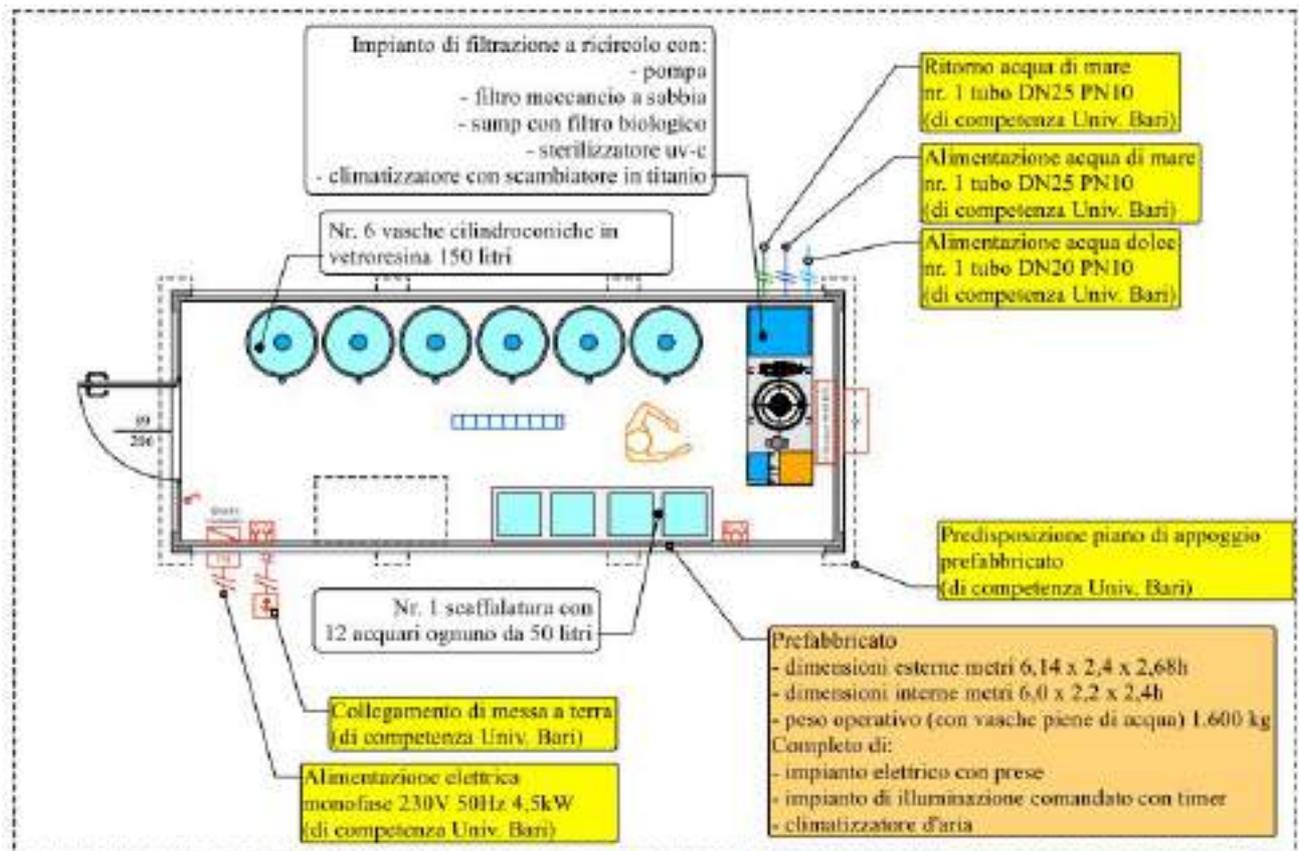
Entrambi i box per la gestione degli adulti e delle larve di riccio di mare nonché per la produzione di alghe sono dotate di n. 2 linee per l’acqua: la linea di lavoro che porta acqua marina nel sistema per il ricircolo o circolo di acqua nell’impianto e la linea di acqua dolce che serve per la manutenzione degli stessi box e delle attrezzature.

I box sono dotati di climatizzazione e coibentazione, oltre che di un canale centrale disposto nel pavimento per la raccolta dell’acqua e scarico all’esterno. Le dimensioni esterne del box sono pari a 6,14 x 2,4 x 2,68 h., misure che all’occorrenza lo rendono idoneo ad essere trasportato su mezzo pesante.

I dispositivi e le attrezzature dislocati all’interno risultano essere:

- scaffale in alluminio con 12 acquari da 40 litri, completo di tubazioni e valvole per l’aerazione ed il ricircolo dell’acqua;

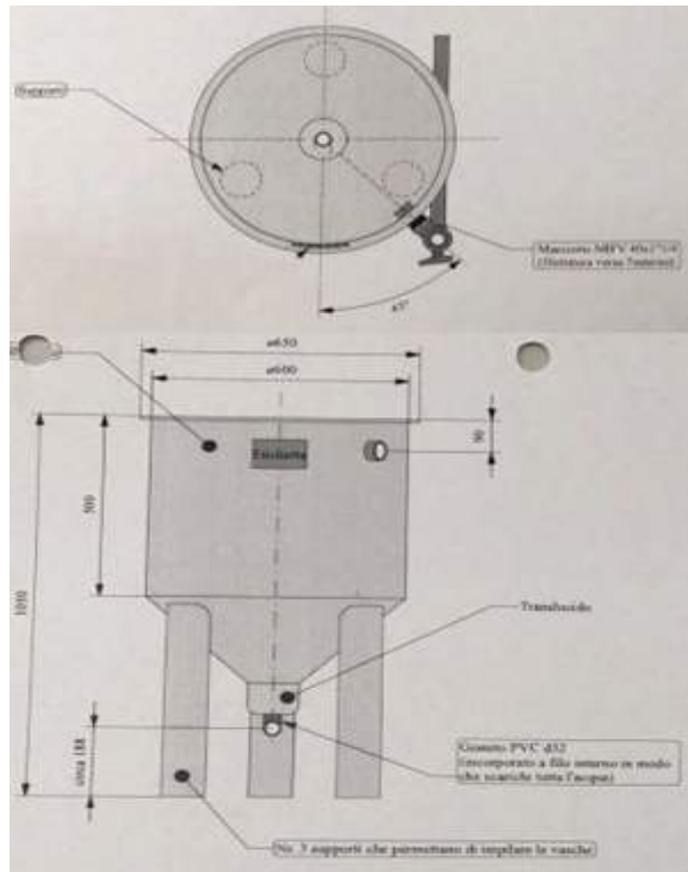
- n. 6 vasche troncoconiche in vetroresina da 150 litri, completo di impianto di filtrazione a ricircolo con sump, pompa di ricircolo, filtro meccanico, sterilizzatore UV, climatizzatore con scambiatore in titanio;
- impianto elettrico per il comando di tutte le attrezzature;
- impianto idraulico per il ricircolo ed il bypass dell'acqua.



Box mobile progettato per la gestione dei riproduttori e delle larve di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Le vasche troncoconiche in vetroresina per acqua marina da 150 litri (complete di supporto, tubi e rubinetteria di carico e filtro a tamburo sull'uscita) misurano 60 cm di diametro interno e 85 cm di altezza, di cui 50 cm per la parte cilindrica e 35 cm per la parte conica. Le vasche distano dal pavimento del box per circa 20 cm, per consentire un agevole accesso e controllo della valvola di scarico presente sul fondo delle stesse.

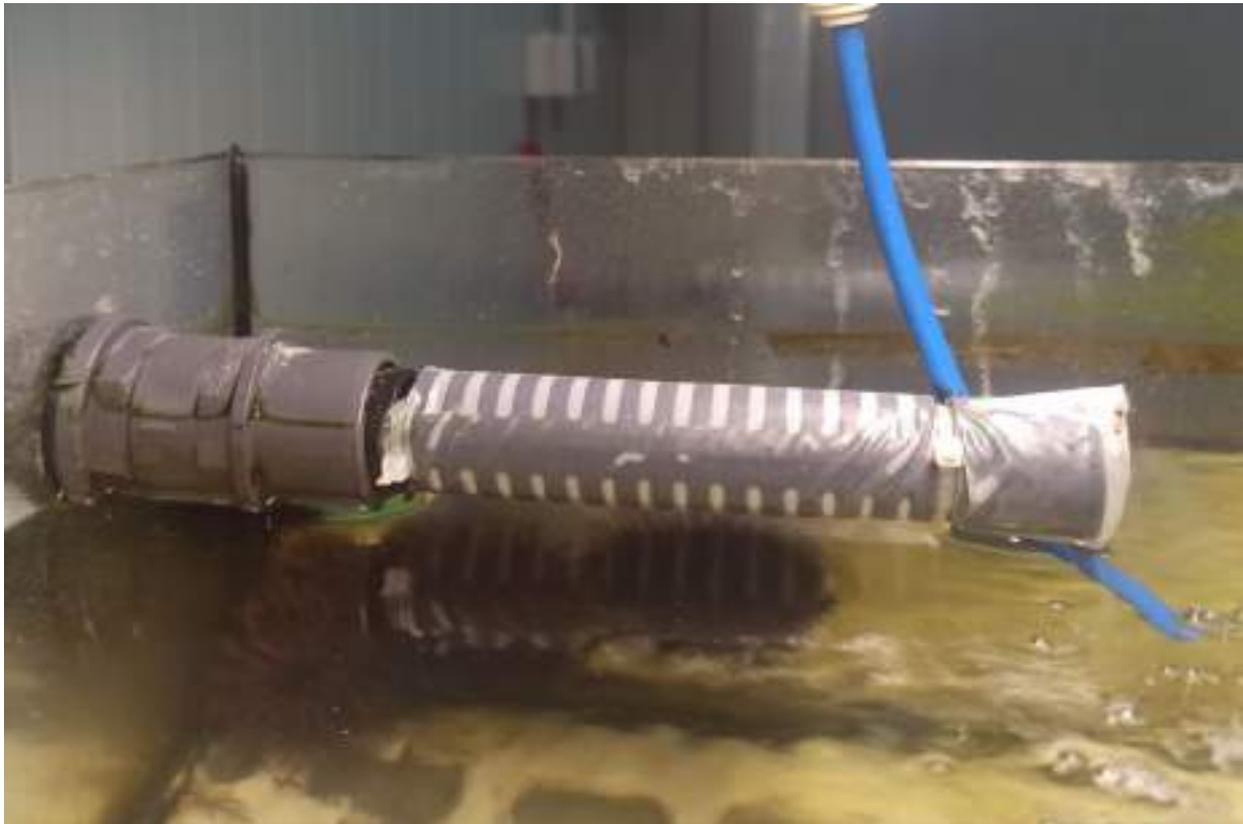
Le misure delle vasche possono variare in un range ristretto, tenendo conto delle dimensioni interni del box, ma comunque l'altezza complessiva della vasca, considerando la parte conica inferiore e lo spazio per gli scarichi, non deve superare i 150 cm.



Schema delle vasche per l'allevamento larvale del riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Il numero stabilito delle vasche consente di condurre sperimentazioni su n. 2 gruppi in triplicato oppure n. 3 gruppi in duplicato. Per quanto riguarda il confinamento degli adulti, lo scaffale predisposto all'interno del box alloggerà n. 12 acquari da 40 litri.

Lo scarico degli acquari può essere dotato di calze filtranti per impedire ai gameti, che potrebbero essere emessi spontaneamente durante il condizionamento alla maturazione gonadale, di fuoriuscire dagli acquari.



Calza filtrante sullo scarico di uno degli acquari per il condizionamento degli adulti di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

In questo modo è facilitato il prelievo dei gameti dagli acquari mediante un'operazione di sifonaggio e trasferimento diretto nelle vasche di accrescimento larvale.

Il box è dotato di climatizzatore ambientale per meglio controllare la temperatura di esercizio dell'impianto a supporto del climatizzatore con scambiatore di titanio inserito nel circuito in cui circola l'acqua marina.

Nel box, inoltre, è possibile gestire le fonti luminose sia mediante un timer che consente di modificare il fotoperiodo sia con la sostituzione delle lampade per impiegare differenti lunghezze d'onda per il condizionamento degli adulti in cattività al fine di ottenere l'emissione dei gameti necessari per la produzione delle larve da allevare e/o in funzione delle performance di crescita nel corso delle fasi di accrescimento larvale.



Infine, in fase di progettazione è stato deciso di dotare le vasche troncoconiche di una valvola di scarico disposta sotto ciascuna vasca che permette di far defluire l'alimento non consumato e/o le feci prodotte in un raccogliatore esterno al fine di condurre studi sulla digeribilità di nuovi alimenti che possono essere testati per la messa a punto di protocolli di alimentazione.

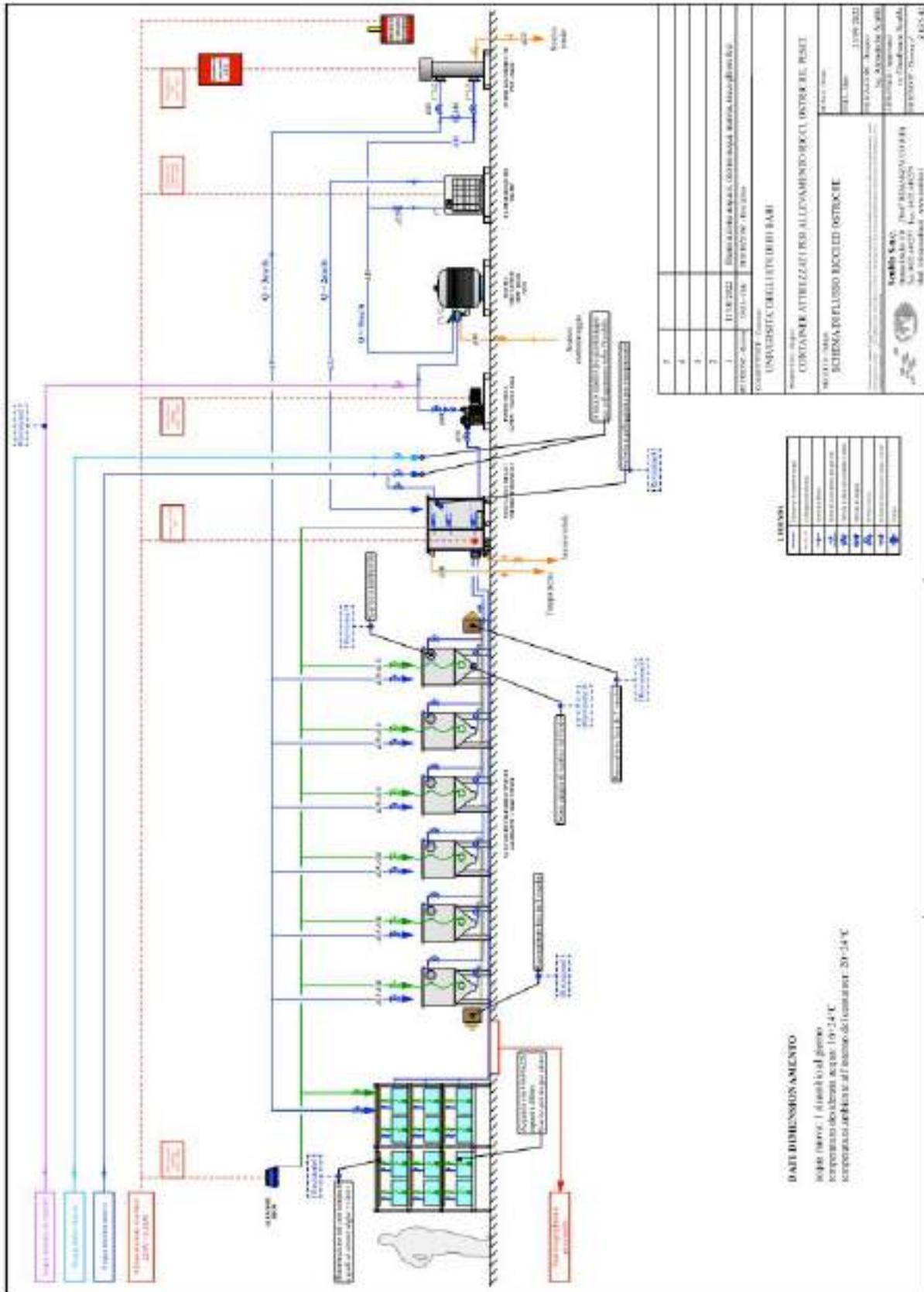
Questa particolare caratteristica delle vasche è stata disegnata allo scopo di condurre studi di digeribilità specificatamente per specie ittiche in fase di accrescimento larvale e giovanile, in previsione di potenziali sperimentazioni da poter condurre nella stazione mobile ed offrire, pertanto, al gruppo di ricerca del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro un più ampio ventaglio di linea di ricerca scientifica da sviluppare.

Particolare attenzione è stata dedicata alla progettazione dei flussi d'acqua nell'impianto, predisponendo la possibilità di far lavorare l'impianto a ricircolo d'acqua e, all'occorrenza, di far lavorare l'impianto in modalità aperta cioè con flusso continuo di acqua di mare che entra nell'impianto, attraversa i dispositivi di filtraggio e sterilizzazione e che è indirizzato in uscita verso vasche esterne all'impianto per il monitoraggio dei parametri chimico-fisici dell'acqua prima che questa torni in mare (in questo caso, lo scarico dovrà essere autorizzato dalle autorità competenti).



DIPARTIMENTO DI BIOSCENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Schema di flusso dell'acqua marina nel box dedicato ai ricci di mare.



Una delle innovazioni nella progettazione del prototipo è tutta concentrata nella modalità di gestione del flusso d'acqua e soprattutto nell'impiego di organismi vegetali, come le alghe verdi appartenenti al genere *Chetomorpha* da inserire nella sump, per favorire la riduzione nell'acqua di nitriti e nitrati e, quindi, dell'ammonio con maggiore efficienza rispetto ai batteri nitrificatori e denitrificatori, soprattutto nelle fasi molto delicate dell'allevamento larvale.

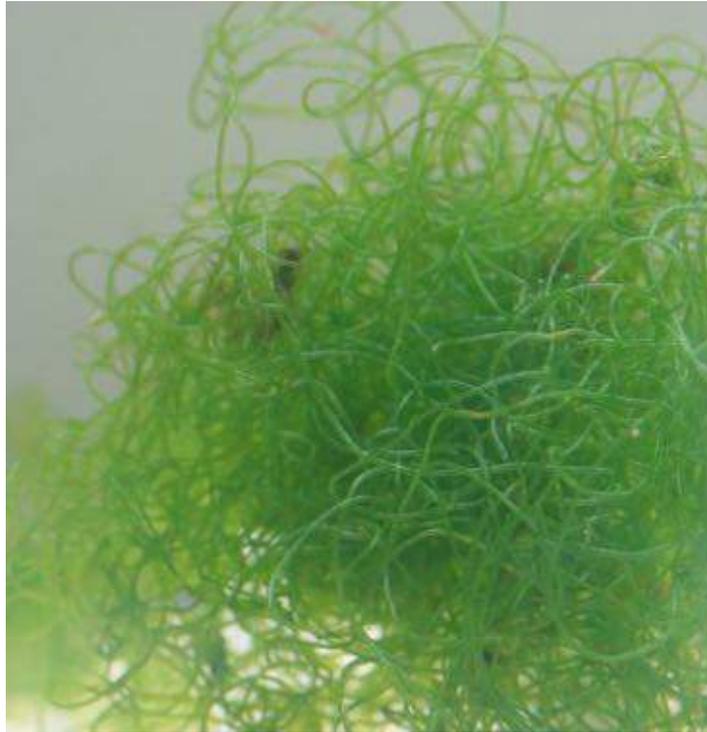
La sump è progettata per accogliere sia bioballs come substrato per la crescita dei batteri nitrificanti, che intervengono nei processi di demolizione della principale molecola tossica presente in ambiente acquatico confinato in presenza di produttori di sostanza azotata (quest'ultima rappresentata fondamentalmente dalle feci degli animali e dal mangime non consumato), sia macroalghe vive in grado di rimuovere i nitrati dall'ambiente acquatico.



Bioballs impiegate come supporto per la crescita dei batteri nitrificanti.

Per quanto riguarda le macroalghe, esse rappresentano un potenziale supporto alla gestione dei prodotti azotati negli impianti a ricircolo in acquacoltura (caratteristiche che attualmente sono tipiche delle avannotterie e degli impianti sperimentali a terra) con una riduzione del carico azotato presente in acqua compresa tra il 18% e il 25% (Hall and Martin, 2021).

L'impiego di macroalghe, come la *Chaetomorpha* crassa può essere, pertanto, un valido supporto all'azione dei prima citati batteri nitrificanti che prima ossidano l'ammoniaca e producono nitriti (ad esempio, i *Nitrosomonas*) e che poi ossidano i nitriti e producono nitrati (ad esempio, i *Nitrobacter*), questi ultimi disponibili per essere assorbiti proprio dalle macroalghe (Gao et al., 2018).

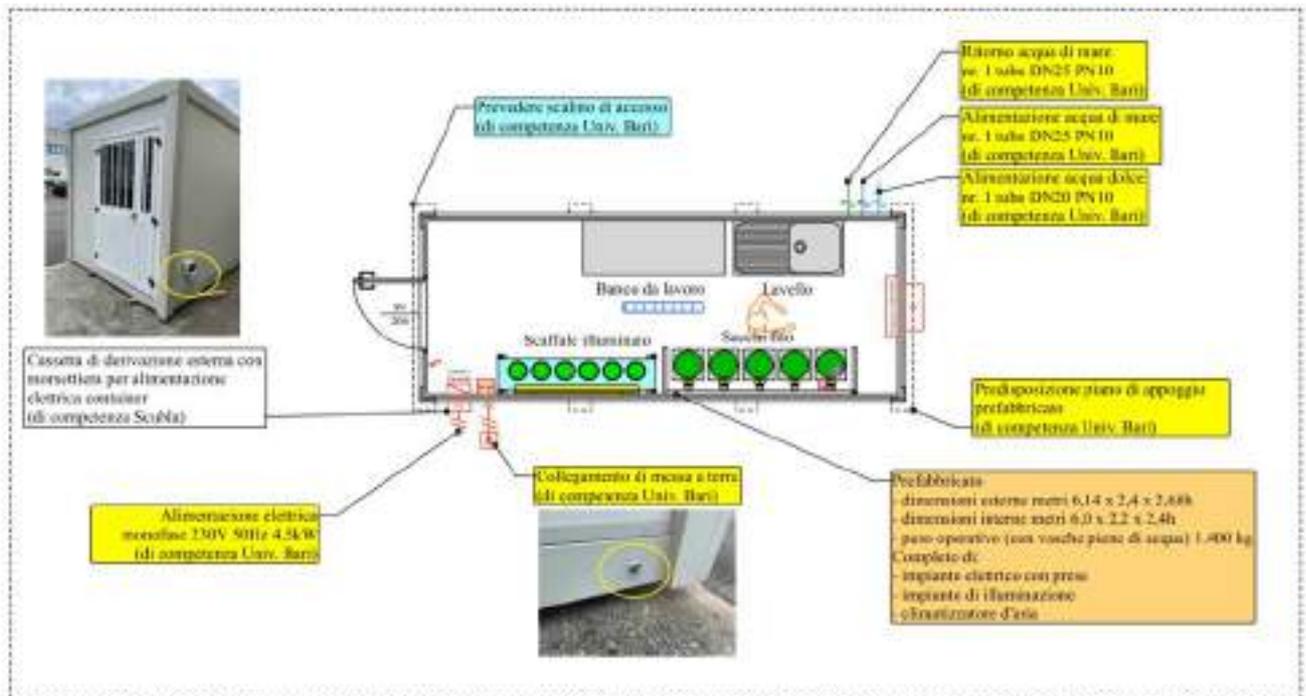


Chaetomorpha crassa, (Kützing, 1845) macroalga della famiglia delle *Cladophoraceae*.

Il box destinato all'allevamento algale ha le stesse dimensioni del box precedentemente descritto.

L'allestimento di questo box consiste in:

- una struttura scaffale in alluminio con 4 ripiani ciascuno dei quali è dotato di illuminazione con lampade fotostimolanti;
- n. 24 contenitori in policarbonato da 5,7 litri con coperchio;
- una struttura standard per 5 sacchi fitoplancton da 190 litri cadauno composta da contenitori in rete metallica, illuminazione con lampade fotostimolanti e aerazione;
- un lavatoio industriale a giorno, 1 vasca con uno sgocciolatoio dx, con dimensioni 1400 x 700 x 850 h mm;
- un tavolo neutro con ripiano inferiore, piano inox ed alzatina posteriore, con dimensioni pari a 1800 x 700 x 850 h mm.



Box mobile progettato per la gestione delle alghe unicellulari.

Le alghe unicellulari o microalghe, meglio note come fitoplancton, sono organismi microscopici, unicellulari che vivono singolarmente o in colonie, in acque dolci e salate. Sono inoltre tra i componenti più importanti nelle catene alimentari degli ecosistemi acquatici.

La biomassa microalgale è una ricca fonte di composti biologicamente attivi, quali: polisaccaridi, proteine/enzimi, acidi grassi, steroli, pigmenti, vitamine, alcaloidi, aminoacidi, antiossidanti e tossine.

La maggior parte delle specie di microalghe presenta un contenuto in proteine superiore al 50% del suo peso secco (Jacob-Lopes et al. 2019).

Le microalghe producono anche elevate quantità di lipidi, tra cui acidi grassi ω -3 e ω -6, tra quest'ultimi abbiamo l'acido gamma linolenico (GLA), mentre tra i più importanti acidi ω -3 abbiamo invece l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA).

Oltre alla vitamina A, le microalghe sono ricche di vitamina C, E, K, tiamina, piridossina, riboflavina, niacina, biotina e tocoferolo (Behl et al. 2020).

A seconda della specie, le dimensioni delle microalghe possono variare da pochi micrometri a qualche centinaio, questo spiega la scelta di coltivare tre differenti specie *Nannochloropsis*, *Isochrysis* e *Thalassiosira*, in modo da soddisfare il fabbisogno dei diversi stadi larvali (Carboni et al.,2012; Castilla-Gavilán et al. 2018).



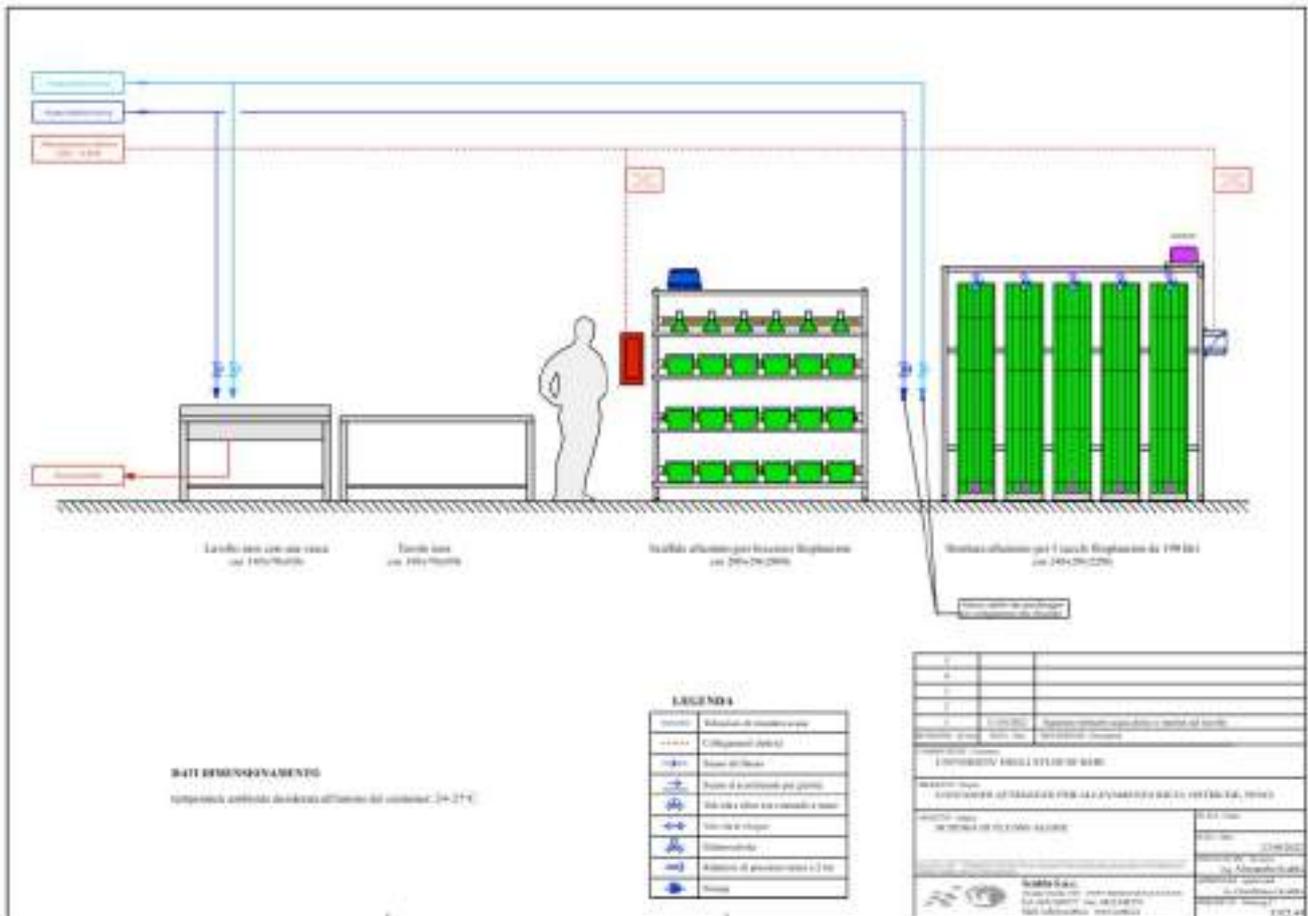
L'avvio della coltura algale avviene nei contenitori in policarbonato per poi trasferire una parte della coltura nei sacchi da 190 litri, non appena in tali contenitori è raggiunta una densità algale adeguata (max capacità possibile).

In entrambe le colture è aggiunta una quantità adeguata di acqua marina per ripristinare i volumi totali e una quantità proporzionata di elementi nutritivi utili alla crescita algale. Quando nei sacchi da 190 litri le densità algali hanno raggiunto valori ottimali, si preleva la quantità necessaria per l'alimentazione larvale e si ripristina il volume e la quantità ottimale di nutrienti.

È stata prevista la possibilità di avviare contemporaneamente su ripiani diversi colture di diverse specie di alghe, in funzione delle dimensioni delle cellule vegetali, adeguatamente selezionate per alimentare le larve dei ricci di mare nelle diverse fasi di accrescimento, assecondando pertanto la capacità degli echinoplutei di alimentarsi con alghe sempre più grandi.

È possibile anche prevedere la formulazione di diete composte da un mix di alghe appartenenti a diverse specie, in funzione della loro diversa composizione chimica e, pertanto, del loro differente apporto nutrizionale.

Anche per questo box è stata posta particolare attenzione al flusso d'acqua che alimenta i ricambi di acqua nei contenitori di policarbonato e nei sacchi, essendo possibile gestire tale flusso con la stessa acqua che alimenta il box dove sono allocati gli esemplari adulti e le larve in accrescimento, generando un unico ambiente acquatico marino con le stesse caratteristiche chimico-fisiche, oppure con una fonte separata di acqua marina.



Schema di flusso nel box mobile progettato per l'allevamento delle alghe unicellulari.

Per quanto riguarda le fonti luminose, poiché la luce influenza le attività metaboliche dei microrganismi fotosintetici, sono stati implementati all'interno dei box dei sistemi di illuminazione artificiali con la possibilità di modulare lo spettro luminoso più adatto al tipo di coltivazione e di aumentare la quantità di luce disponibile alle microalghe.

L'uso di lampade a stretto contatto con i microrganismi e ad energia e potenza variabile, permette di evitare fenomeni di stress da alte temperature (Mukherjee, Madhu e Wangikar 2020).

Un ulteriore fattore che è stato tenuto in debita considerazione per la produzione algale è l'aria che deve essere insufflata nel reattore, essa può essere inserita a diverse velocità in base a quanto si vuole movimentare la coltura.

Un sistema di agitazione efficiente permette di migliorare il trasferimento di massa e la sospensione delle cellule, eliminare i gradienti di luce, inoltre, garantisce un'omogenea miscelazione dei nutrienti.



Per la realizzazione della stazione mobile è stato necessario prima allestire l'area dove posizionare i box su di una base di cemento che include le linee elettriche e le linee idrauliche accessibili mediante pozzetti di servizio. Tre putrelle di acciaio su poi poggiare in piano i box sono state disposte sulla base in cemento, oltre che consentire di alzare i box quanto basta per effettuare i collegamenti con gli scarichi al di sotto degli stessi box.



Massetto di cemento armato con putrelle per la posa dei box.

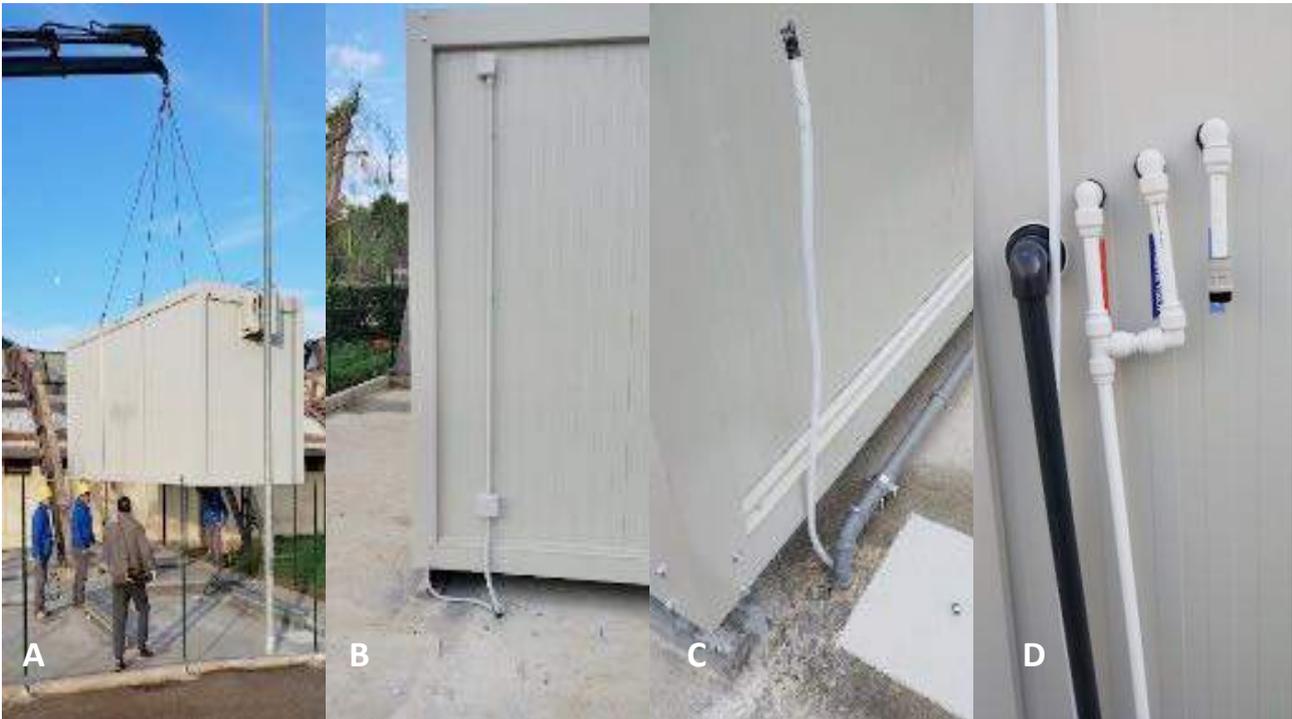
In merito alle linee idrauliche è stata approntato il collegamento soltanto con il carico di acqua dolce, oltre che con gli scarichi di servizio sia dai canali centrali interni ai box sia dal lavello nel box delle alghe.

È stata ovviamente approntata la linea di carico dell'acqua di mare ma, nel caso specifico, l'impianto è stato alimentato con acqua marina costituita a partire da acqua dolce alla quale sono stati aggiunti sali di primissima scelta.

Il posizionamento dei box è stato eseguito a regolare d'arte, posizionando gli stessi in piano e collegandoli alle linee elettrica e idraulica.



PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Posizionamento dei box (A), collegamento elettrico (B), collegamenti idraulici (C), entrate ed uscite acqua dolce e salata (D).

Successivamente all'arrivo nel mese di marzo 2023 dei dispositivi e delle attrezzature da installare nei box, si è proceduto all'allestimento di questi ultimi.



Box per i riproduttori e le larve di riccio di mare *Paracentrotus lividus* con vasche troncoconiche, sump, pompa e filtro meccanico, lampada UV e centraline di controllo in allestimento.



Il box per la riproduzione e l'allevamento larvale del riccio di mare è stato allestito con n. 6 vasche troncoconiche da 150 litri ciascuna e con n. 12 acquari da 40 litri ciascuno, oltre che con i sistemi per il ricircolo dell'acqua salata (pompa e sump) e per il condizionamento della temperatura (chiller con scambiatore in titanio, quest'ultimo ideale per acqua marina).



Box per i riproduttori e le larve di riccio di mare *Paracentrotus lividus* con scaffale per acquari in allestimento.

Per la filtrazione meccanica, è stato impiegato come substrato il vetro che rappresenta una innovazione tecnologica rispetto alla sabbia di quarzo generalmente utilizzata in questo tipo di impiego.



Il vetro ridotto in frantumi e con granulometria di 0,5-1,0 mm è un elemento filtrante è molto più fine della sabbia di quarzo: elimina la torbidità e le sostanze organiche, ha un grado di filtrazione superiore del 30% e ha proprietà chimico-fisiche che lo rende auto sterilizzante.

La sabbia è un buon filtro meccanico, ma è anche un terreno di coltura ideale per i batteri. Nel giro di pochi giorni ogni granello di sabbia è colonizzato da batteri, tra i quali possono proliferare anche agenti patogeni. A causa delle contaminazioni, le prestazioni di un filtro a sabbia peggiorano drasticamente dopo 12-18 mesi, benché venga effettuato un frequente contro-lavaggio. Le prestazioni del filtro a vetro, invece, rimangono costantemente elevate per molti anni.

Nel box gli acquari sono stati collocati sullo scaffale e successivamente collegati alla linea idraulica che serve anche le vasche. Su ogni ripiano dello scaffale, e per tutta la lunghezza dello stesso, è predisposta una fonte luminosa controllata da un timer.

Gli acquari ricevono areazione dal sistema che alimenta le pietre porose dislocate anche nelle vasche, anche se è possibile dosare il flusso di aria in ogni singola vasca ed acquario.



Box per allevamento delle alghe in allestimento (sx); fotobioreattori in funzione con tre linee attive in cui sono coltivate tre specie algali (dx).

La postazione di coltura algale è composta da 24 fotobioreattori da 3 litri ciascuno disposti su 4 file. Ogni fila, composta da 6 fotobioreattori, è stata destinata alla coltura di una specie algale con un totale di 18 litri ciascuna.



Nel mentre si procedeva all'avvio delle procedure di acquisto presso il fornitore SCUBLA srl, il personale del team di Medicina Veterinaria si recava in missione nei primi giorni di luglio 2022 presso l'Università di Sassari, in occasione di un incontro accademico tra esponenti della ricerca scientifica in ambito acquacoltura, allo scopo di incontrare alcuni tra i ricercatori che in Sardegna da diversi anni sono coinvolti in esperienze di gestione del ciclo biologico di questa specie in condizioni di cattività.

In ogni caso, già dall'avvio delle attività progettuali, in attesa di poter disporre della stazione mobile prototipale prevista dal progetto, il gruppo di ricerca del DiMEv ha avviato presso le infrastrutture del Dipartimento di Medicina Veterinaria a Valenzano (BA) l'allestimento di una stazione sperimentale per la stabulazione adulti con la disposizione di due acquari da 400 e 150 litri, con sistema di ricircolo, e allevamento larvale (vasca da 2 metri cubi, al vecchio impianto), oltre che un fotobioreattore per la produzione algale. In attesa della stazione mobile.



Acquario da 400 litri per la gestione degli adulti di riccio di mare.



PO FEAMP 2014/2020 + Misura 1.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 + APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE + Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 + Relazione Finale Tecnico-Scientifico + Novembre 2023



Acquario da 400 litri per la gestione degli adulti di riccio di mare.

Inoltre, è stato allestito un primo lotto di contenitori dotati di areazione per la gestione delle eventuali uova fecondate e delle larve appena schiuse, prima del trasferimento degli echinoplutei in una vasca da 2 metri cubi destinata all'accrescimento larvale.



Contenitori per la gestione delle uova appena fecondate (sx) e vasca da 2 metri cubi per l'accrescimento larvale (dx; in attesa dell'installazione della stazione mobile).



Infine, è stato allestito un fotobioreattore per la produzione di fitoplancton quale alimento per le larve in accrescimento. A questo, si sono aggiunti dei dispositivi artigianali, allestiti dai colleghi del DipBio, utili ad incrementare la produzione di fitoplancton per l'alimentazione larvale sia per i ricci di mare sia per le ostriche.



Fotobioreattore (sx) e dispositivo artigianale per la produzione di fitoplancton.

Nel periodo tra marzo e ottobre 2022, sono stati condotti diversi campionamenti di esemplari di ricci adulti, oltre che di campioni di acqua e sedimenti, nelle due aree di Cerano (BR) e del Golfo di Taranto. Il campionamento degli esemplari è stato condotto per diversi mesi a causa della difficoltà nel reperire esemplari adulti, in quanto le popolazioni costiere sia nell'Adriatico meridionale sia nel Golfo di Taranto sono molto rarefatte e composte per la maggior parte da individui giovanili con diametro, cioè, minore di 7 cm aculei compresi.

Al fine di comporre la popolazione sperimentale negli acquari da 400 e 150 litri, prima, e negli acquari della stazione mobile successivamente all'installazione dei box e relativa attrezzatura, è stato pertanto necessario investigare la costa pugliese adriatica, dal Gargano al Salento, e nel Golfo di Taranto, alla ricerca di individui idonei da pescare grazie all'intercessione di pescatori professionali e alla disponibilità, da giugno 2022 per un anno di noleggio, di una imbarcazione a disposizione delle attività progettuali operante nel Golfo di Taranto.

Oltre agli individui pescati di volta in volta che sono stati stabulati negli acquari temporaneamente allestiti, in attesa dell'installazione della stazione mobile, sono stati prelevati individui destinati alle analisi sia delle gonadi al fine di valutarne la maturazione sessuale sia degli inquinanti chimici eventualmente bioaccumulati per la valutazione degli aspetti sanitari ed ambientali (Attività 4).

Dati biometrici degli individui di *Paracentrotus lividus* che hanno costituito la popolazione sperimentale.

	Area di Cerano (BR) (n. 40 individui)		Golfo di Taranto (n. 40 individui)	
	diametro (cm)	peso totale (g)	diametro (cm)	peso totale (g)
min	7,0	31,83	7,0	30,44
max	9,0	71,36	8,0	38,56
media	7,8	48,50	7,2	32,95
dv	0,6	11,27	0,2	1,84

Dall'analisi dei parametri biometrici è risultato che, a parità di dimensioni, gli individui dell'area adriatica sembrano avere un peso medio maggiore degli individui dell'area del Golfo di Taranto, anche se in quest'area le dimensioni della popolazione sono distribuite in maniera più omogenea.



Una possibile spiegazione può essere legata all'influenza dell'ambiente marino in cui gli individui crescono sulla struttura, composizione e deposizione dei carbonati che compongono l'esoscheletro dell'echinoderma, oltre al differente sviluppo delle gonadi il cui peso influenza notevolmente il peso totale dell'individuo quando questo è in stadio avanzato di maturità sessuale.

Sugli individui che hanno costituito la popolazione sottoposta a sperimentazione, sono state condotte periodicamente analisi sullo studio dello sviluppo maturativo delle gonadi al fine di verificare se le condizioni di stabulazione fossero idonee per ottenere una emissione spontanea di gameti.

Dopo avere classificato gli esemplari da sacrificare, con l'ausilio di un paio di forbici si è provveduto a tagliare le placche ambulacrali esteriorizzando le gonadi per la successiva determinazione dell'indice gonadico (IG) e sviluppo evolutivo delle gonadi.

L'indice gonadico mette in evidenza la produzione gonadica rispetto al resto del corpo, anche se le dimensioni in sé delle gonadi non sono indice dello stato gametogenico nella fase riproduttiva (Boudouresque & Verlaque, 2007).

L'IG dei ricci di mare in natura variare enormemente dal 1% al 20%, questa variabilità è dovuta alla disponibilità alimentare, alle condizioni ambientali (come periodo di luce diurna, temperatura dell'acqua e presenza / assenza di correnti d'acqua) e allo stato di moltiplicazione gonadico.

Perciò, grandi differenze possono verificarsi in natura sia tra gli individui all'interno di una popolazione, sia tra popolazioni di ricci vicine tra loro: anche con IG molto basso, i ricci di mare sono in grado di sopravvivere per lunghi periodi (mesi), con poco o addirittura senza cibo, in quanto hanno la capacità di controllare il loro metabolismo e le loro funzioni biologiche (come la riproduzione).

La valutazione dell'IG è stata effettuata pesando il riccio in toto (peso umido totale di riccio di mare), e le gonadi isolate (peso umido).

La formula utilizzata (Fabbrocini, 2011; Tenuzzo, 2012) è la seguente:

$$\text{indice gonadico (IG)} = [\text{peso della gonade (g)} / \text{peso totale del riccio (g)}] \times 100.$$

Gli indici gonadici risultanti dalla formula utilizzata sono stati suddivisi per data di rilevazione e luogo. Lo sviluppo gonadico meglio definita fase riproduttiva è stato determinato con l'esame istologico delle stesse gonadi.

I campioni scelti sono stati prima misurati con il calibro di Vernier utilizzando soggetti con 7 cm di diametro o maggiore e successivamente pesati con una bilancia analitica.



Calibro di Vernier (sx) e bilancia analitica (dx) per il rilievo dei dati biometrici di esemplari di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

Successivamente, con un paio di forbici è stata tagliata a metà l'esoscheletro del riccio di mare a livello delle piastre ambulacrali e le gonadi sono state rimosse con una spatola-cucchiaio da laboratorio, pesate e, successivamente, una porzione di esse è stata immersa in formalina tamponata al 10% per la fissazione. Dopo 3 giorni, le gonadi sono state poste nelle cassette di inclusione per l'elaborazione, sezionate a 4 μm , deparaffinate e colorate con Hematoxylin Eosin, PAS, Masson's Trichrome.



Histokinette (sx) per l'inclusione dei campioni di gonadi in paraffina, microtomo (dx) per il taglio del campione in sezioni da sottoporre a colorazione istochimica.

I campioni sono stati esaminati al microscopio ottico Leika DM4000 con ingrandimento 100x, per confermarne il sesso; quindi, sono stati selezionati casualmente 5 campi a 400x ingrandimenti, classificandole secondo Byrne (1990), che divide il ciclo gonadico in sei fasi.



Microscopio per l'analisi istologica, oltre che per l'analisi dell'immagine computerizzata.

I cambiamenti all'interno delle gonadi vengono classificati nel corso del ciclo maturativo sessuale in base alle proporzioni relative delle due popolazioni di cellule principali che compongono l'epitelio germinale: le cellule germinali (oogoni, ovociti ecc e spermatogoni, spermatoцити ecc.) e cellule somatiche o fagociti nutritivi (NP). L'esame istologico delle gonadi ha evidenziato che nel ciclo gonadico si identificano 6 fasi per entrambi i sessi.

Nell'ovaio

Fase I: detta *recovery stage* o fase ricostituzione gonadica che inizia dopo la deposizione delle uova, con la presenza di piccole goccioline derivanti da lisi degli ovociti PAS+, fagociti nutritivi (NP) in numero ridotto e di piccole dimensioni. Presenti ovociti primari (pre-vitellogenic), di 5-30 micron, localizzati sulla parete esterna della massa gonadica, come piccoli granuli scuri fortemente basofili (colorazione viola scuro H/E, e blu con PAS+).

Fase II: *growing stage* o fase di crescita gli ovociti primari vitellogenic (EV), sempre meno basofili, aumentati di dimensioni (da 10 a 50 micron) con nuclei (N) visibili, con fagociti nutritivi aumentano di numero e volume per accumulano molecole nutritive, mucopolisaccaridi e la vitellogenina, considerata il precursore della MYP (Major Yolk Protein). Il significativo aumento della dimensione delle gonadi è attribuibile a un accelerato accumulo di questa proteina.



Fase III *premature stage* o fase prematura, la vitellogenesi continua, gli ovociti si presentano di varie dimensioni di forma ovoidale, raggiungendo un diametro di circa 90 micron. Il tessuto di riserva comincia a diminuire così come i fagociti che si spostano nella porzione centrale, con riduzione della positività al PAS. Quando gli ovociti primari hanno raggiunto la massima dimensione finiscono la loro maturazione, e gli ovuli si accumulano al centro del lume, gli echinodermi sono pronti per l'emissione.

Fase IV *mature stage* o fase matura: gli acini gonadici sono stipati di uova mature fitta sono in, fittamente stipate, fortemente eosinofile alla colorazione PAS, con diametro superiore ai 90 .micron. I fagociti sono quasi completamente scomparsi.

Fase V: *partly spawned stage* o fase post deposizione: gli ovuli sono rilasciati nel gonodotto, l'ovaio si presenta con ovuli maturi, caratteristico è lo spazio vuoto e scarso tessuto nutritivo.

Fase VI: *spent stage* o stadio di esaurimento le pareti dell'ovaio sono assottigliate. Gli ovociti residui si presentano di forma irregolare o conica che successivamente saranno fagocitati. Il tessuto nutritivo comincia a riformarsi, e può occupare una vasta area. La fase VI porta alla fase I, con la comparsa dei primi ovociti nella parete gonadica.

Nel testicolo

Fase I: *recovery stage* o fase ricostituzione gonadica i testicoli presentano un sottile strato di spermatogoni e spermatociti primari lungo le pareti degli acini. I fagociti nutritivi (NP), nel lume formano un reticolo con residui di spermatozoi.

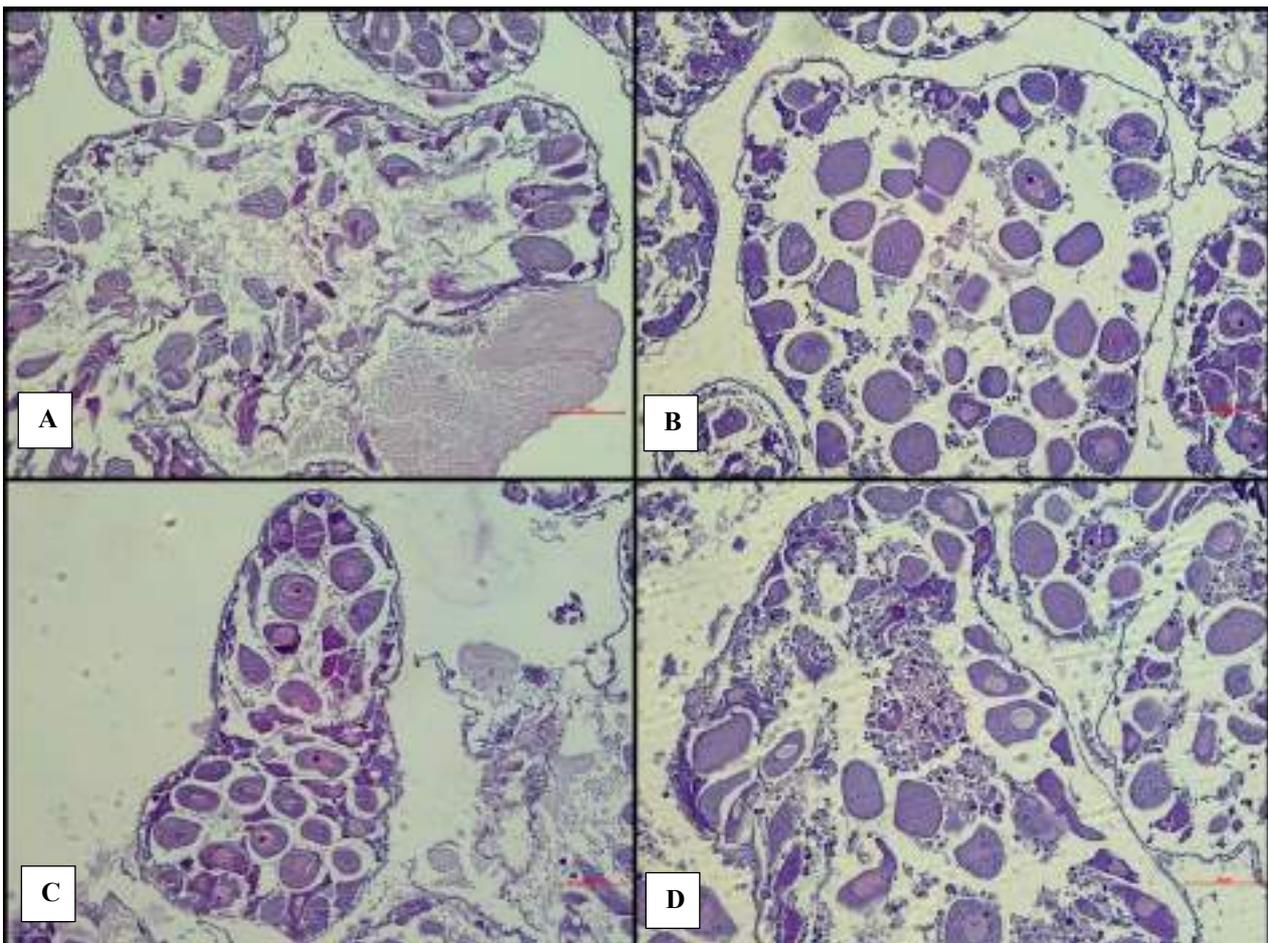
Fase II: *growing stage* o fase di crescita in cui si evidenzia la parte centrale dell'acino con un reticolo compatto ripieno di NP intensamente PAS positivo. Colonne di cellule germinali, spermatociti, si proiettano dalla periferia verso il centro del lume.

Fase III: *premature stage* o stadio prematuro in cui gli spermatociti si addossano sulla parete dell'acino; gli spermatozoi invece si incominciano ad accumulare nel lume.

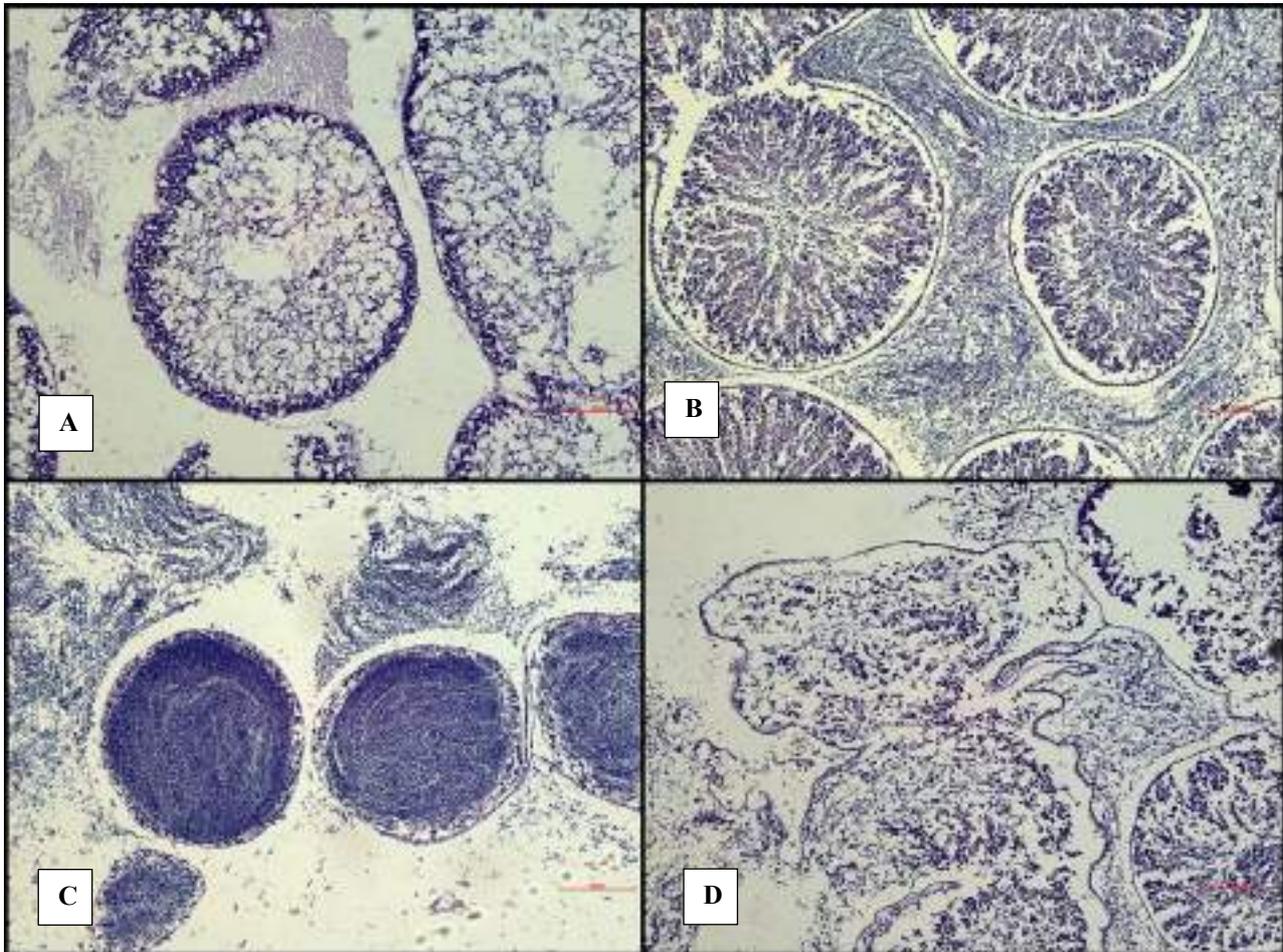
Fase IV: *mature stage* o fase matura gli spermatozoi sono presenti nella zona centrale dell'acino, i fagociti nutritivi diminuiti notevolmente di numero sono situati perifericamente

Fase V: *partly spawned stage* o fase post emissione gli spermatozoi vengono rilasciati nel gonodotto. In questa fase i testicoli sono simili a quelli della Fase IV, eccetto che per la presenza di una minore concentrazione di spermatozoi negli spazi del lume dell'acino.

Fase VI: *spent stage* o stadio II il lume si presenta vuoto di spermatozoi potrebbero essere ancora presenti nel gonodotto, le pareti dell'acino sono sottili, gli NP in periferia sono vuoti o fagocitanti gli spermatozoi.



Sezioni istologiche di gonadi femminili in esemplari di riccio di mare *Paracentrotus lividus* pescati in Adriatico meridionale e nel Golfo di Taranto nel corso delle attività progettuali. (A) inter-gametogenesi e fagocitosi NP; (B) pre-gametogenesi e rinnovamento NP; (C) gametogenesi e utilizzo di NP; (D) fine della gametogenesi ed esaurimento NP con deposizione delle uova. Gli inserti mostrano viste con ingrandimento microscopico a 10x.



Sezioni istologiche di gonadi maschili in esemplari di riccio di mare *Paracentrotus lividus* pescati in Adriatico meridionale e nel Golfo di Taranto nel corso delle attività progettuali. (A) pre-gametogenesi e rinnovamento NP; (B) gametogenesi precoce e utilizzo di NP; (C) gametogenesi tardiva e utilizzo di NP; (D) fine della gametogenesi, esaurimento NP e deposizione degli spermatozoi. Gli inserti mostrano una vista con ingrandimento microscopico a 10x.



Per l'analisi della motilità ed efficienza fecondativa degli spermatozoi, lo sperma è stato raccolto mediante una pipetta Pasteur in una provetta Eppendorf, addizionato con 20 ml di tampone di conservazione e centrifugato a $2000 \times g$ per 5 minuti.

Alla fine, il surnatante è stato rimosso e gli spermatozoi risospesi in tampone hardware di acqua di mare e incubati per dieci minuti per acquisire motilità. Successivamente, un'aliquota da 2 μ l è stata caricata in una camera Leja per analizzare la motilità degli spermatozoi mediante un Computer Assisted Sperm Analyser (CASA).

La configurazione ottica dello strumento è stata modificata per rilevare e analizzare gli spermatozoi di riccio di mare. Per ciascun campione sono state registrate le percentuali di cellule mobili (MOT) e quelle di cellule mobili progressive (PMOT).

I risultati relativi alla valutazione della cinetica spermatica, per cellule mobili (MOT) e cellule mobili progressive (PMOT), hanno mostrato variazioni stagionali direttamente correlate alle diverse condizioni ambientali considerando l'umidità, temperatura ambientale e temperatura dell'acqua.

Gli animali in cattività, comunque, non hanno raggiunto uno stadio maturativo idoneo alla riproduzione autunnale, sicuramente perché nel periodo marzo-ottobre 2022 l'alimentazione era in fase sperimentale e, quindi, non sufficiente a sostenere le esigenze energetiche tipiche del periodo di maturazione sessuale.

In ogni caso, verso la fine del mese di ottobre 2022, un pool di esemplari provenienti dall'area adriatica è risultato composto da individui con stadio maturativo avanzato; pertanto, si è proceduto alle prove di stimolazione degli individui mediante iniezioni in cavità peritoneale di cloruro di potassio (KCL) 1 M, comunemente alla dose di 40 μ l per grammo di peso corporeo (Carboni, 2012), per ottenere uova mature e spermatozoi fluenti, con l'obiettivo di procurarsi uova fecondate da destinare all'allevamento larvale. all'induzione forzata dei gameti

I maschi sono stati individuati per la presenza sulla parte dorsale del riccio, dello sperma di colorito biancastro, le femmine, invece, per la presenza di uova con un colorito rossastro.

Dagli adulti, sacrificati, sono state prelevate le gonadi per gli studi istologici, oltre per il calcolo dell'indice gonadosomatico che ha mostrato un valore medio di $IG=4,27$ (min:2,80, max: 5,46, dv: 0,82) indicativo della presenza di individui maturi sessualmente.

Gli ovuli e gli spermatozoi sono stati raccolti in becher separati, in acqua filtrata, e miscelati con acqua di mare ricostituita, successivamente mescolati per la fecondazione, mantenendo una temperatura di 24 °C circa per tre ore. Il tasso di fecondazione valutato dopo le prime tre ore era del 60% a

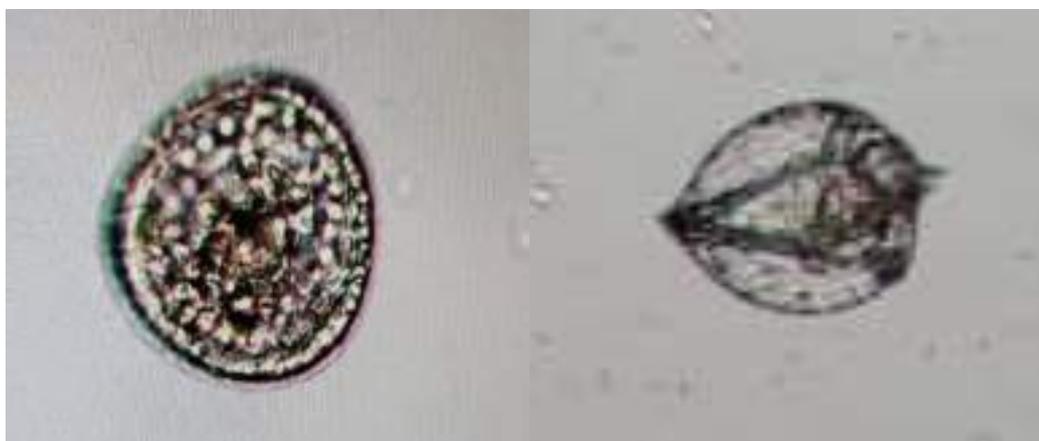


ottobre 2022 mentre era del 80% in marzo-aprile 2023.

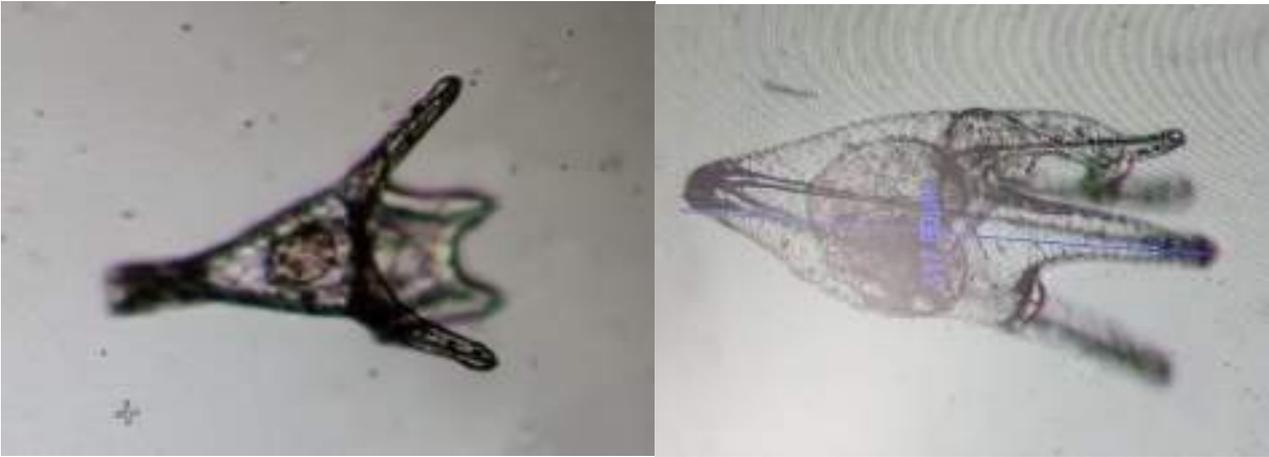


Ottobre 2022 - lotti di uova di riccio di mare *Paracentrotus lividus* fecondate, filtrate (sx) e in areazione per 24 ore fino ad avvenuta schiusa.

Ad avvenuta fecondazione, è stata stimata una produzione di circa 2 milioni di uova fecondate che sono state divise in più becker per un volume totale di 100 litri, con annesse cannule per l'ossigenazione per circa 3 giorni con una densità di circa 20 uova/1 ml acqua. Successivamente, considerando una mortalità rilevata di circa il 20% fino alla schiusa dell'uovo fecondato, gli echinoplutei sono stati trasferiti nella vasca da 2 metri cubi, ma con 1 metro cubo di acqua e con sistema di ricircolo completo e un fotoperiodo naturale, con una densità di circa 2 larve/1 ml acqua, per un totale di circa 1,6 milioni di larve di riccio di mare.



Uovo fecondato di riccio di mare *Paracentrotus lividus* (sx) ed embrione (dx) in fase finale di formazione.



Echinopluteo di *Paracentrotus lividus* di 4 giorni (sx) e di 10 giorni (dx).

La prima alimentazione dei plutei è stata effettuata dopo 48 ore, con alghe unicellulari di *Nannochloropsis*, con una concentrazione crescente da 4000 a 15000/ml; al decimo giorno venivano aggiunte alghe unicellulari *Dunaliella* e *Dinophysis* coltivate nei fotobioreattori con raggiungimento di concentrazioni 10.000.000/ml.

Le alghe sono state coltivate con acqua ricostituita con sale marino a densità di 1026, multivitaminico (B1, B12, H, cloruro di ferro, cloruro di manganese, acido borico, EDTA sodico, fosfato di sodio, nitrato di sodio, cloruro di zinco, cloruro di cobalto, molibdato di ammonio, solfato di rame); per le diatomee veniva aggiunto in più silicato di sodio (silicato di sodio, acido cloridrico).

La durata planctonica è stata di circa quattro settimane crescendo 94,5 volte di più del volume dell'uovo. L'allevamento larvale è terminato dopo circa 40 giorni dalla fecondazione, durante il quale le larve hanno subito notevoli cambiamenti morfologici, con la formazione dell'echinopluteo, larva pelagica, con un numero variabile di braccia fino alla forma giovanile bentonica.



Foto echinopluteo con otto braccia (35 giorni), in fase avanzata di metamorfosi.

A metà dicembre 2022, considerando una mortalità intorno al 70%, veniva rilasciato il primo lotto di circa 500.000 giovanili di riccio di mare in un'area del Golfo di Taranto, nelle vicinanze di Capo San Vito.



Foto uscita a mare nel Golfo di Taranto per il rilascio di esemplari giovanili di riccio di mare a dicembre 2022.

Nel periodo gennaio-marzo 2023, i prelievi di adulti selvatici sono proseguiti al fine di mantenere stabile la popolazione sperimentale anche in previsione dell'arrivo ed allestimento della stazione mobile, prevista per marzo 2023.

Nel mese di marzo 2023, dopo l'allestimento della stazione mobile, ed anche nel mese successivo, un paio pool di esemplari provenienti uno dall'area adriatica e l'altro dal Golfo di Taranto sono risultati composti da individui con stadio maturativo avanzato; pertanto, si è proceduto alle prove di stimolazione come precedentemente eseguito.

Dagli adulti, sacrificati, sono state prelevate le gonadi per gli studi istologici e per il calcolo dell'indice gonadosomatico, che anche in questo caso ha evidenziato la presenza di individui le cui gonadi erano in stadio di maturazione finale e pronte, pertanto, all'emissione di gameti.

Indice Gonadosomatico in individui di riccio di mare *Paracentrotus lividus* campionati a marzo-aprile 2023 in Adriatico e Golfo di Taranto.

	Area di Cerano (BR) (n. 5 individui)	Golfo di Taranto (n. 5 individui)
min	2,64	4,45
max	5,42	5,05
media	3,88	4,70
dv	0,99	0,14

La gestione delle uova fecondate, questa volta, è stata condotta presso l'impianto allocato nella stazione mobile, anche se è stata replicata la stessa procedura precedentemente implementata nelle diverse fasi di sviluppo larvale inclusa anche la gestione dell'alimentazione.

Ad avvenuta fecondazione, per entrambi i lotti pescati a marzo e ad aprile 2023, è stata stimata una produzione totale di circa 3 milioni di uova fecondate che sono stati divisi in più becker per un volume totale di 150 litri, con annesse cannule per l'ossigenazione per circa 3 giorni con una densità di circa 20 uova/1 ml acqua.

Successivamente, considerando una mortalità rilevata di circa il 35% fino alla schiusa dell'uovo fecondato, le larve sono state trasferite nelle 6 vasche da 150 litri ciascuna con una densità di circa 2 larve/1 ml acqua, per un totale di circa 2 milioni di larve di riccio di mare. L'allevamento larvale è durato circa 40 giorni e la mortalità larvale, fino al raggiungimento della forma bentonica, si è ridotta intorno al 50%. Nel mese di maggio e giugno 2023, pertanto, sono stati rilasciati altri lotti di individui di riccio di mare nella stessa area del Golfo di Taranto precedentemente selezionata, per un totale di circa 1 milione di giovanili bentonici rilasciati a mare.



Per quanto riguarda, invece, gli esemplari adulti allocati negli acquari nella stazione mobile, essi sono attualmente soggetti a prove preliminari di alimentazione. Entrambe le due popolazioni sono state divise in tre gruppi sperimentali composti da due unità sperimentali ognuno.

Ogni replicato tecnico consiste in un acquario da 40 litri. La prima prova, attualmente in atto, vede la somministrazione di tre differenti diete vegetali isoproteiche (30%) e isolipidiche (5%) formulate con percentuali differenti di spirulina per valutare una correlazione tra dose algale e appetibilità del mangime così formulato.

Prove preliminari di formulazione diete isoproteiche (30%) e isolipidiche (5%) a base vegetale per l'alimentazione degli adulti di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

	Dieta A	Dieta B	Dieta C
Spirulina in polvere	0 %	1,7 %	6,7 %
Farina di mais	12,0 %	9,0 %	13,0 %
Farina di grano tenero	13,0 %	15,5 %	12,8 %
Farina di soia	62,5 %	61,1 %	55,0 %
Olio vegetale	3,5 %	3,7 %	3,5 %
Integratore Vit/Min	3,0 %	3,0 %	3,0 %
Fosfato bicalcico	2,0 %	2,0 %	2,0 %
Carbonato di calcio	4,0 %	4,0 %	4,0 %

Successivamente le due popolazioni saranno sottoposte ad una successiva prova preliminare con mangime formulato con le medesime materie prime ma con un contenuto proteico inferiore.

Dieta seconda prova preliminare isoproteiche (15%) e isolipidiche (5%) a base vegetale per l'alimentazione degli adulti di riccio di mare *Paracentrotus lividus*.

	Dieta A	Dieta B	Dieta C
Spirulina in polvere	0 %	1,7 %	6,7 %
Farina di mais	33,0 %	33,0 %	34,5 %
Farina di grano tenero	33,0 %	33,8 %	34,3 %
Farina di soia	21,5 %	19,0 %	12,0 %
Olio vegetale	3,5 %	3,5 %	3,5 %
Integratore Vit/Min	3,0 %	3,0 %	3,0 %
Fosfato bicalcico	2,0 %	2,0 %	2,0 %
Carbonato di calcio	4,0 %	4,0 %	4,0 %

Le materie prime sono state dapprima macinate singolarmente con un micronizzatore e successivamente miscelate in un mixer professionale nelle giuste proporzioni secondo la formulazione delle diete in preparazione.



Mix di materie prime, dieta A, B e C rispettivamente da sinistra a destra.

Al mix di prodotti selezionati è stata aggiunta una diversa quantità di spirulina secondo specifiche percentuali (riportate nella precedente tabella).

Le miscele così ottenute sono state amalgamate con un mescolatore da laboratorio discontinuo (MLH, WAM Italia S.p.A.) e, in seguito, addizionate del legante agar al 2,5% (Agar E 406, B&C srl, Valenzano, IT) come indicato da (Ciriminna et al. 2021).

Il composto è stato formellato in capsule disposte in piastre con diametro da 60 mm e altezza 10 mm e stoccato a -20° C. All'occorrenza, le piastre sono scongelate 24 h prima della somministrazione.



Mangime addizionato di Agar, dieta A, B e C rispettivamente da sinistra a destra.

Lo scopo delle due prove preliminari è quello di identificare la dose di spirulina più idonea a rendere il mangime formulato più appetibile e la dose proteica più performante in termini di supporto allo sviluppo della gonade e all'incremento dell'IGS. Una corretta alimentazione degli adulti, oltre al controllo dei parametri chimico fisici dell'acqua in cui sono confinati, consente di indurre la maturazione delle gonadi e, pertanto, l'emissione di gameti di alta qualità (Volpe et al., 2018).

Le prove di alimentazione sono attualmente in atto e hanno l'obiettivo di identificare la ricetta nutrizionalmente valida ai fini riproduttivi e la corretta percentuale di agar che possa garantire durabilità del mangime in acqua per più di 48 ore, consentendo agli esemplari adulti di soddisfare le richieste nutrizionali secondo i propri ritmi nel corso della permanenza in cattività e allo stesso tempo evitando di intorbidire l'acqua e di aggravare troppo il lavoro del sistema di filtrazione, nel caso di un veloce disfacimento della capsula di mangime.



Esemplari adulti di riccio di mare *Paracentrotus lividus* intenti ad alimentarsi con i mangimi formulati secondo le diete sperimentali.



Prospettive di capitalizzazione dei risultati di progetto

L'allestimento della stazione mobile oggetto del presente lavoro rappresenta non solo l'obiettivo perseguito dal progetto di ricerca finanziato dal FEAMP 2014-2020, ma anche una opportunità per la messa a punto di protocolli sia per l'alimentazione di adulti di riccio di mare in cattività al fine di condizionare la maturazione delle gonadi sia per l'allevamento larvale fino alla forma bentonica. In questo contesto, l'utilizzo della stazione mobile per la produzione di giovanili bentonici di riccio di mare può sostenere anche potenziali programmi di ripopolamento di questa specie lungo le coste pugliesi.

Le attività che possono essere svolte presso la stazione mobile potranno offrire un supporto a potenziali attività di acquacoltura rivolte a questa specie, sostenendo la crescente necessità di far fronte alla scarsità di risorse naturali sovra sfruttate e garantendo la sostenibilità economica di un comparto che attualmente si basa esclusivamente sul prelievo dalla popolazione selvatica.

Successivamente, sarà possibile sperimentare modelli gestionali per larve, giovanili e adulti di riccio di mare *Paracentrotus lividus* che consentano di chiudere il ciclo biologico in cattività e, pertanto, avviare allevamenti ecosostenibili su larga scala in maniera tale da soddisfare a pieno la crescente richiesta del mercato ed evitare l'eccessivo sfruttamento della risorsa naturale.

Il motivo per cui la progettazione dell'impianto per la gestione dei riproduttori e delle larve di riccio di mare prevedeva l'allestimento in containers è connesso con la facilità con cui essi possono essere facilmente trasferiti su mezzi di trasporto idonei. In questo modo è possibile spostare l'impianto in base alle esigenze operative come quella prevista dall'Università degli Studi di Bari che ha in programma l'attivazione del Corso di Laurea Triennale in Scienze delle produzioni e delle risorse del mare, a partire da ottobre 2023 presso la sede distaccata di Taranto. Questa nuova offerta formativa coinvolgerà una importante popolazione studentesca proveniente principalmente dalle regioni di Puglia, Basilicata e Calabria.

L'obiettivo del suddetto Corso di Laurea avrà finalità di formare esperti del settore che siano in grado di colmare la carenza di personale tecnico nel settore dell'acquacoltura e per fornire un supporto specialistico alle aziende.

Le nuove figure professionali potranno rispondere alle esigenze del comparto produttivo grazie alle elevate competenze tecniche fornite da questo corso di studi, nonché sostenere le aziende del settore nel trasferimento delle conoscenze ed innovazioni utili al rilancio del settore.

L'acquisizione della stazione mobile e delle competenze relative alla gestione in cattività del riccio di mare *Paracentrotus lividus* consente al Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli

Studi di Bari di pianificare potenziali azioni di ripopolamento del riccio di mare lungo le coste pugliesi nell'ambito della prossima programmazione dei FEAMP.

Esempi di azioni di ripopolamento già condotti nel Mediterraneo potranno essere utilizzati come base di partenza per applicare i migliori modelli per l'analisi delle dinamiche di distribuzione del riccio di mare durante il monitoraggio delle attività (Couvray et al., 2015).

L'attuale situazione in Puglia in relazione alla gestione della pesca di questa risorsa è stata recentemente regolamentata con l'entrata in vigore della Legge della Regione Puglia n.6 del 18 aprile 2023 "Misure di salvaguardia per la tutela del riccio di mare". Le disposizioni di legge vietano per 3 anni il prelievo, la raccolta, la detenzione, il trasporto, lo sbarco e la commercializzazione di esemplari pescati lungo le coste pugliesi e relativi prodotti derivati freschi.

Il divieto imposto dalla legge è essenzialmente finalizzato a permettere il ristoro della popolazione selvatica di riccio di mare sottraendola alla pressione di pesca per un periodo che si è ritenuto congruo sulla base delle conoscenze scientifiche.

Si ritiene che la sospensione dello sfruttamento di questa specie sia una ottima occasione per avviare in Puglia un programma di ripopolamento del riccio di mare, in collaborazione con tutti gli operatori del settore, i cui risultati potranno fornire importanti indicazioni gestionali per questa specie.



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
PO 2014-2020
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente

PO FEAMP 2014/2020

Misura **2.47** - Innovazione art. **47** Reg. **508/2014**

Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20

APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE

ATTIVITÀ 3 **Allevamento di nuove specie, invertebrati marini filtratori e alghe, in grado di ridurre l'impatto degli allevamenti ittici attraverso azioni di *bioremediation***





PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 • Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

GRUPPO DI LAVORO

Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente, Università di Bari Aldo Moro

Caterina Longo, Responsabile Scientifico Attività 3
Cataldo Pierri
Roberta Trani
Giuseppe Corriero
Carlotta Nonnis Marzano
Joseba Aguilo-Arce
Miriam Ravisato
Antonella Schiavo
Maria Concetta de Pinto
Annamaria Ragone
Federico Vita
Maria Scrascia
Carlo Pazzani
Emanuela Luciani

COISPA Tecnologia & Ricerca s.c.r.l.

Pierluigi Carbonara
Lola Toomey
Sébastien Alfonso
Cosmidano Neglia
Giuseppe Lembo



FEAMP
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

INDICE

SINTESI DELLE ATTIVITÀ SVOLTE	101
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	105
CAPITOLO 2 FASE 1: SPERIMENTAZIONE DEL PROTOTIPO DI SISTEMA DI ALLEVAMENTO MULTI-TROFICO AD INVERTEBRATI E ALGHE IN LABORATORIO	126
CAPITOLO 3 FASE 2: SPERIMENTAZIONE DEL PROTOTIPO DI SISTEMA DI ALLEVAMENTO MULTI-TROFICO AD INVERTEBRATI E ALGHE IN CAMPO	170
CAPITOLO 4 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	204
CAPITOLO 5 BIBLIOGRAFIA	208

SINTESI DELLE ATTIVITÀ SVOLTE

L'acquacoltura è uno dei settori della produzione di alimenti di origine acquatica in più rapida crescita e fornisce una parte sostanziale dei prodotti ittici consumati abitualmente. Tuttavia, la rapida espansione dell'acquacoltura presenta numerose sfide da fronteggiare, tra cui la gestione della qualità dell'acqua e la sostenibilità ambientale. Lo scarico di effluenti ricchi di sostanza organica, sostanze nutritive e potenziali contaminanti dagli impianti di acquacoltura, può portare a impatti dannosi sugli ecosistemi acquatici. Le stesse specie ittiche in allevamento possono espellere notevoli quantità di sostanze organiche, incidendo sulla qualità dell'acqua di allevamento, che a sua volta potrebbe avere un impatto negativo sulla crescita e sul benessere degli stessi pesci allevati.

Per affrontare questi problemi, sono state esplorate varie strategie per migliorare la sostenibilità delle pratiche di acquacoltura. L'uso di macroalghe, spugne e anellidi per il biorisanamento in acquacoltura ha attirato l'attenzione grazie alle loro eccezionali capacità di mitigazione degli impatti derivanti dai processi di allevamento. Questi organismi, infatti, hanno la capacità di rimuovere nutrienti, particelle sospese e assimilare la materia organica disciolta in acqua, determinando un miglioramento della qualità dell'acqua. Vari studi hanno messo in evidenza la capacità di questi organismi di ridurre i carichi di nutrienti, mitigare gli effetti dannosi della materia organica in eccesso, rimuovere agenti patogeni e contaminanti dall'acqua di allevamento. Questo approccio promettente può offrire una soluzione sostenibile ed economicamente vantaggiosa per ridurre, ad esempio, l'eutrofizzazione e la carica batterica nelle aree circostanti gli impianti di acquacoltura, ma ad oggi l'impiego di questi organismi è poco diffuso.

L'attività svolta ha previsto studi, in laboratorio e in campo, finalizzati ad implementare le conoscenze utili a progettare e potenziare sistemi di acquacoltura sostenibili rispettosi dell'ambiente, resilienti e competitivi basati sulla promozione della *Low Trophic Aquaculture* (LTA) e *Integrated Multitrophic Aquaculture* (IMTA). A tal fine sono state effettuate ricerche utilizzando invertebrati marini filtratori e macroalghe finalizzate a valutare le capacità di biorisanamento nei confronti di diverse categorie di inquinanti ed è stato sperimentato un prototipo di sistema multi-trofico ad invertebrati ed alghe.

In particolare, nella **prima fase di laboratorio** sono state selezionate e testate le *performance* di biorisanamento di diversi organismi marini, tra cui la macroalga *Chaetomorpha linum* e la demospongia *Sarcotragus spinosulus*. Sono stati condotti test anche sul mantenimento in acquario di alcune specie di poriferi tra cui *Axinella cannabina* e *Aplysina aerophoba*; è stato realizzato e testato un prototipo di co-allevamento multi-trofico con spigole, poriferi e macroalghe. Infine, è stata condotta un'indagine per valutare l'interesse degli acquariofili italiani nei confronti dei poriferi e la loro disponibilità ad acquistarli come specie ornamentali.

Nella **seconda fase di sperimentazione in campo**, è stato progettato e allestito presso il centro di acquacoltura sperimentale “COISPA Tecnologia & Ricerca” un sistema di acquacoltura multi-trofica integrata (IMTA) con orate, spugne, policheti e macroalghe, replicabile in sistemi di allevamento in vasca *land-based*.

Gli esperimenti condotti in laboratorio con *C. linum* hanno dimostrato che una biomassa algale, con densità di 10 mg/L, è capace di sottrarre dall’acqua più della metà dei sali di azoto e fosforo aggiunti in soluzione (10 mg/L di ammonio e di nitrati, 5 mg/L di fosfati) dopo 24 ore, e di rimuoverli completamente dopo 96 ore.

Le analisi condotte in laboratorio con la spugna *S. spinosulus* hanno permesso di descrivere la sua efficienza di filtrazione nei confronti del batterio patogeno *Vibrio parahaemolyticus*. In particolare, sono state testate due concentrazioni batteriche, 10^4 e 10^6 CFU/mL. I risultati ottenuti durante gli esperimenti di laboratorio, hanno dimostrato che una biomassa di 41,6 mL/L (15 g_{DW}/L) di *S. spinosulus* può controllare efficacemente la crescita del batterio *V. parahaemolyticus* ad entrambe le concentrazioni, mostrando un’efficienza di ritenzione batterica prossima al 100% e una *Clearance rate* massima di 45,0 mL/(g_{DW}*h).

La sperimentazione condotta sul mantenimento in acquario di due demosponge (*Axinella cannabina* e *Aplysina aerophoba*) ha previsto il monitoraggio dello stato di salute, del tasso di accrescimento e di sopravvivenza e delle concentrazioni dei nutrienti (nitriti, nitrati e fosfati) nell’acqua dei mesocosmi. Gli espianti di spugna sono stati alimentati con tre microalghe liofilizzate di dimensioni e composizione nutrizionale variabili: *Isocrisis aff. galbana* (diametro 4-8 µm), *Nannocloropsis* sp. (diametro 2-4 µm) e *Thalassiosira weissflogii* (diametro 10-50 µm). Un quarto regime alimentare consisteva in una miscela delle tre microalghe in rapporto 1:1:1. Nel complesso, al termine del periodo di osservazione, la sopravvivenza per *A. aerophoba* e *A. cannabina* è stata rispettivamente del 58,33% e del 94,44%. Per quanto riguarda il monitoraggio del peso degli espianti, è stato osservato che alla fine dell’esperimento il peso umido medio delle due specie è risultato pari all’88±1% per *A. aerophoba* e al 108±1% per *A. cannabina*, rispetto ai pesi iniziali. Inoltre, una ulteriore sperimentazione di tre mesi condotta con espianti di diverse specie di demosponge (*A. aerophoba*, *Geodia cydonium*, *S. spinosulus* e *Hymeniacidon perlevis*) ha evidenziato che le migliori prestazioni sono state ottenute con *H. perlevis* che ha mostrato un incremento mensile della superficie di circa il 16%.

Sulla base dei risultati ottenuti da questa prima fase, è stato realizzato, in scala di laboratorio, un prototipo di co-allevamento multi-trofico costituito da 3 componenti: pesci (*Dicentrarchus labrax*), spugne (*S. spinosulus*) e alghe (*C. linum*). Questo sistema è stato realizzato in vasche contenenti 15 L di acqua marina filtrata ciascuno e per un periodo complessivo di 5 giorni in cui sono stati misurate giornalmente le concentrazioni dei nutrienti e della carica batterica. I risultati ottenuti hanno dimostrato l’efficienza del sistema multi-trofico realizzato. I valori delle concentrazioni dei nutrienti nelle vasche con i biorisanatori sono risultati costanti per tutto il periodo di osservazione e sempre inferiori a 1 mg/L, diversamente da quanto registrato per le vasche contenenti le sole spigole in cui i fosfati e l’ammonio hanno raggiunto rispettivamente valori finali di 2,02 ±0,39 mg/L e 11,3 ±1,2 mg/L. Anche le analisi microbiologiche hanno mostrato valori inferiori (fino a tre ordini di grandezza) dei parametri microbiologici misurati nelle vasche con i biorisanatori rispetto alle vasche controllo (senza biorisanatori).

Al termine delle sperimentazioni in laboratorio, è stata condotta un'indagine, attraverso la diffusione di un questionario in tutta Italia, con l'obiettivo di valutare l'interesse degli acquariofili nei confronti dei poriferi e la loro disponibilità ad acquistarli come specie ornamentali (*Citizen Science approach*). Sono state raccolte complessivamente 101 interviste di partecipanti distribuiti in quasi tutte le regioni italiane, prevalentemente al nord (Lombardia, Liguria, Veneto ed Emilia-Romagna) e al sud (Puglia), di età media di 38 anni. Quasi il 90% dei partecipanti ha dichiarato di avere conoscenze sui poriferi e sulla capacità di filtrazione, mentre solo il 22% dichiara di conoscere i sistemi IMTA e il loro funzionamento, indipendentemente dal loro livello di istruzione. Gli intervistati alla domanda sull'ipotetica intenzione di acquisto di spugne allevate in sistemi di produzione sostenibili, solo il 17% del totale non ha mostrato interesse, mentre 2 intervistati su 3 hanno manifestato interesse ad acquistarle. Questa prima indagine apre nuove prospettive di valorizzazione di questi invertebrati nel settore dell'acquariologia che favorirebbe la diffusione di pratiche di allevamento sostenibili e ridurrebbe la pressione di raccolta sulle popolazioni naturali.

La sperimentazione del prototipo del sistema di biorisanamento in campo condotta presso la sede della COISPA Tecnologia & Ricerca ha previsto l'allestimento di diverse vasche: una con orate (*Sparus aurata*) e biorisanatori (poriferi: *Hymeniacidon perlevis*, policheti: *Sabella spallanzanii* e macroalghe: *Chaetomorpha linum*; vasca A, IMTA), una vasca controllo contenente solo orate (vasca C, in duplicato) ed una terza vasca contenente solo i biorisanatori (vasca B) che veniva "alimentata" con l'acqua proveniente dalla vasca controllo. Dal monitoraggio degli organismi biorisanatori, dei pesci e dei parametri (macronutrienti e carica batterica) nell'acqua di allevamento è emerso che: il volume degli espunti di poriferi nella vasca A, dopo una prima fase di acclimatazione che ha fatto registrare un lieve decremento, ha indicato un incremento del 5% circa. Per quanto riguarda i policheti, una volta posizionati in adeguati supporti che ne hanno impedito la predazione da parte delle orate non sono state registrate ulteriori criticità. Infine, dalle analisi sul contenuto di macronutrienti (fosfati, nitrati, nitriti e ammonio) nell'acqua, sebbene siano emersi valori di concentrazione troppo bassi per poter apprezzare differenze significative tra i campioni di acqua provenienti dalle diverse vasche (probabilmente a causa della sensibilità dei metodi utilizzati non sufficientemente elevata), nell'alga della vasca A e della vasca B per tutti i macronutrienti analizzati, ad eccezione dei nitrati, è stato registrato un aumento significativo rispetto ad un elemento di riferimento, il controllo, costituito da alghe campionate in ambienti naturali, ad indicare una buona capacità di assorbire tali nutrienti, riducendone quindi il contenuto nelle acque. L'elevato tasso di attività metabolica registrato nelle alghe della vasca A e B è stato confermato mediante analisi dei livelli di perossidazione lipidica, superiori nelle due vasche rispetto al controllo. Infine, il sistema IMTA è in grado di ridurre la carica batterica nell'acqua secondo quanto osservato dall'esperimento sulla vasca B, con un'attività di rimozione batterica differenziata (prima le Vibrionaceae e dopo *Escherichia coli* e coliformi).

L'allevamento delle orate con diverse condizioni (con e senza biorisanatori) aveva lo scopo di verificare gli effetti sulle condizioni dei pesci della presenza dei biorisanatori in vasca di allevamento (sistema IMTA). Nella sperimentazione sono state monitorate sia le performance di crescita che parametri fisiologici plasmatici ed

ematici (cortisolo, glucosio, lattato, emoglobina, ematocrito, ormone della crescita) e parametri immunologici (proteine totali e Immunoglobulina M IgM). La sperimentazione è durata circa tre mesi (95 giorni) in condizioni controllate e costanti (fotoperiodo, ossigeno, pH e salinità). L'accrescimento ha mostrato essere non significativamente diverso sia dal punto di vista del peso totale che dal punto di vista del rapporto di conversione del mangime (*Feed Condition Ratio*). Inoltre i parametri fisiologici e immunologici come il glucosio, lattato, emoglobina e proteine totali non mostravano differenze significative. L'ormone dello stress (cortisolo) mostrava nel gruppo con IMTA una minore concentrazione così come IgM ed ematocrito, mentre il livello di ormone della crescita era significativamente più alto. Un altro dato tenuto in considerazione è la mortalità che è risultata più alta nel gruppo con IMTA. In generale lo stato fisiologico tra i pesci nei due gruppi sperimentali non è risultato differente, quindi l'introduzione di organismi biorisanatori anche direttamente nelle vasche di allevamento non provoca alterazioni in questo senso. Inoltre, è interessante sottolineare come non ci siano ripercussioni sull'accrescimento e quindi da un punto di vista produttivo. Le differenze riscontrate rientrano nelle variazioni a livello sia individuale che di popolazioni riportate per questa specie in letteratura. Ulteriori approfondimenti dovranno essere, comunque, implementati per poter definire un protocollo standardizzato utilizzabile a livello produttivo in maniera da evitare effetti negativi come quello riguardante la mortalità.



FEAMP
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO**

**DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA**

**PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 • Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA
INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023**

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1	Stato dell'arte ed obiettivi	106
1.2	Descrizione delle specie utilizzate nella sperimentazione	112

1.1 Stato dell'arte ed obiettivi

L'acquacoltura è uno dei settori della produzione alimentare in più rapida crescita e fornisce una parte sostanziale dell'offerta mondiale di prodotti ittici (FAO, 2022). Tuttavia, la rapida espansione dell'acquacoltura ha innescato numerose sfide, tra cui la gestione delle qualità dell'acqua di scarico e la sostenibilità ambientale (FAO, 2022; Granada et al., 2016). Le acque di scarico, infatti, specialmente nel caso di impianti intensivi o semi-intensivi, sono ricche di materia organica, sostanze nutritive e potenziali contaminanti che possono determinare impatti dannosi sugli ecosistemi acquatici circostanti (Granada et al., 2016; Longo et al., 2022). Anche la presenza di agenti patogeni, come virus e batteri, può rappresentare un rischio per le specie allevate in impianti di acquacoltura, nonché per la salute umana (Cavallo & Stabili, 2004; Bondad-Reantaso et al., 2005). Inoltre, le acque di allevamento ricche di sostanze nutritive (azoto e fosforo), possono avere impatti negativi sulla fisiologia dei pesci allevati stessi (Gomez Isaza et al., 2021; Pottinger, 2017).

Per affrontare le sfide ambientali e migliorare la sostenibilità dell'acquacoltura, sono state esplorate diverse strategie, tra cui il biorisanamento. Questa pratica impiega organismi viventi o i loro prodotti per rimuovere, ridurre o neutralizzare vari tipi di inquinanti. Nei sistemi di policoltura con organismi biorisanatori, le cui capacità naturali consentono di ridurre il surplus di nutrienti e di sostanza organica, si ottengono benefici aggiuntivi come una maggiore accettabilità sociale e una diversificazione delle produzioni (Jumah, 2020; Nissar et al., 2022). Questi approcci sono noti come "acquacoltura multi-trofica integrata" (Integrated Multi-Trophic Aquaculture, IMTA) (Guerra-García et al., 2016; Troell et al., 2009).

L'IMTA rappresenta un sistema di policoltura che può essere applicata non solo all'allevamento di specie ittiche ma anche di crostacei (specie alimentate con diete commerciali) a cui è possibile associare specie definite "estrattive" come alghe e invertebrati filtratori o detritivori (es. molluschi ed echinodermi) (Troell et al., 2009; Chopin, 2011; Chopin et al., 2012) (Figura 1.1.A). In questo modo, i prodotti di scarto derivanti dall'allevamento di una specie vengono riciclati per diventare *input* (mangimi, nutrienti) per un'altra, creando sistemi bilanciati ispirati agli equilibri che caratterizzano gli ecosistemi naturali (Barrington et al., 2009).

Attualmente i sistemi IMTA sono presenti, sia su base sperimentale che commerciale, in oltre 40 paesi tra cui Canada, Cile, Cina, Giappone, Stati Uniti e molti paesi europei (Chopin, 2011). Il Bangladesh ha recentemente preso in considerazione l'IMTA come strumento per diversificare la produzione nei sistemi di allevamento (Sarker et al., 2014; Kibria, 2016).

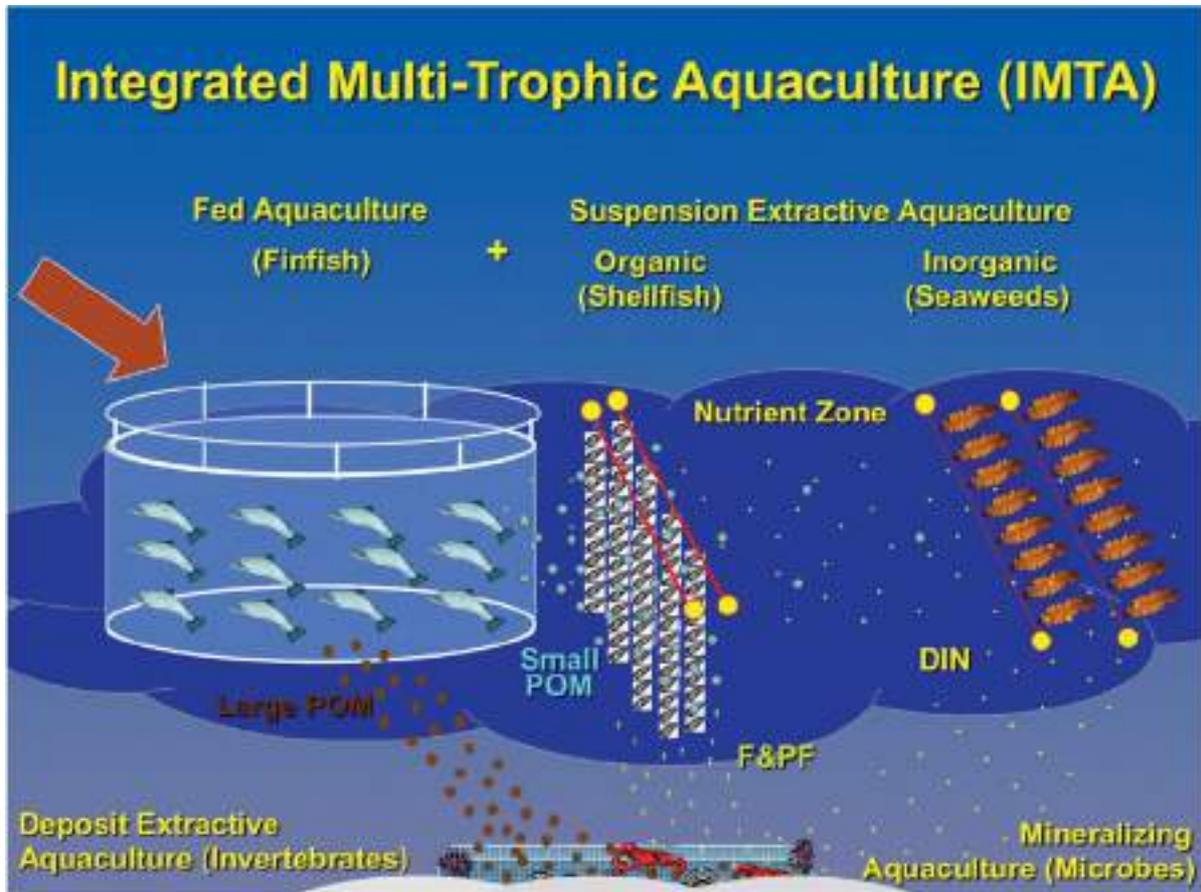


Figura 1.1.A – Schema concettuale di un impianto di acquacoltura multi-trofica integrata (IMTA) (Chopin, 2011).

La policoltura non è una novità in quanto è stata una componente importante dell'industria alimentare per millenni, dove il recupero di sostanze nutritive tra bestiame e seminativi è ancora una pratica comune, e per secoli è stata praticata anche in acquacoltura in sistemi come nella policoltura tradizionale di pesci d'acqua dolce stagnante (e.g. Chopin, 2011; 2013; 2020; Chopin et al., 2008).

Il concetto di IMTA moderno è nato durante un seminario nel 2004, quando Jack Taylor e Thierry Chopin hanno coniato il termine, da allora sono state pubblicate più di 1300 pubblicazioni sul tema dell'IMTA. Il concetto di IMTA è estremamente flessibile, essendo semplicemente un tema che ospita applicazioni in acque libere o in sistemi a terra (es. acquaponiche), marine o d'acqua dolce temperate o tropicali (Chopin, 2013).

Ad oggi, lo sviluppo di sistemi IMTA con organismi biorisanatori sta attraversa una fase sperimentale che riguarda prevalentemente lo studio e realizzazione di sistemi in laboratorio o sistemi sulla terra ferma, dove alle vasche a terra vengono associate strutture per l'allevamento di alghe e di molluschi bivalvi (Bartoli et al., 2003; Franchi & Renzoni, 2003; Giacobbe & Spanò, 2003). In genere, in questi sistemi, la componente algale è utilizzata per abbattere il carico di azoto, soprattutto in forma ammoniacale, prodotto dalle deiezioni dei pesci

e dai processi di decomposizione del mangime inutilizzato; mentre i bivalvi, vengono inseriti per ridurre l'incremento della componente fitoplanctonica innescata dall'aumento dei nutrienti.

Tra i potenziali organismi biorisanatori, recentemente sono state proposte anche specie non eduli come poriferi e policheti i quali hanno mostrato ottime *performance* di biorisanamento non solo nei confronti della componente microbiologica (Ledda et al., 2008; Giangrande et al., 2020; 2021; Gifford et al., 2006; Stabili et al., 2006) (2023; Longo et al., 2010; 2016), ma anche di alcuni inquinanti organici e metalli pesanti (Aresta et al., 2015; Gifford et al., 2004; 2005).

I Poriferi sono descritti in letteratura come efficaci filtratori, capaci di estrarre più dell'80% delle particelle organiche in sospensione comprese tra i 0,5 e 50 micron (sostanza organica disciolta e particolata, batteri eterotrofi, eucarioti eterotrofi, fitoplancton) (Pile et al., 1996; Reiswig 1971; Ribes et al., 1999; van de Vyver et al., 1990). In generale, il picoplancton (<2 micron) ed in particolare il batterioplancton è considerato la maggiore fonte di carbonio per le spugne (Pile et al., 1996; Reiswig 1971; van de Vyver et al. 1990) e può potenzialmente da solo provvedere interamente alla loro dieta, specialmente nelle acque costiere ad alto contenuto organico (Becerro et al., 1994; Hummel et al., 1988; Kefalas et al., 2003). L'alimentazione avviene essenzialmente mediante filtrazione delle particelle alimentari ad opera dei coanociti, anche se una notevole capacità di fagocitosi è stata osservata nei pinacociti che rivestono i canali del sistema acquifero della spugna (Gaino et al., 1994). Questo processo consente alla spugna di assumere particelle alimentari di alcune decine di micron di diametro (Reiswig, 1971). L'elevata efficienza nella rimozione della componente batterica dalla colonna d'acqua, ha suggerito la possibilità di utilizzare i poriferi in attività di biorisanamento, dal momento che i batteri, inclusi quelli potenzialmente patogeni, sono solitamente molto abbondanti in acque con un alto contenuto organico, come baie e aree sottoposte ad attività di acquacoltura intensiva (Corsi et al., 2004; Manconi et al., 1999; Milanese et al., 2003). L'ipotesi di utilizzare poriferi in prossimità di allevamenti ittici per ridurre l'impatto ambientale indotto dall'attività di acquacoltura è supportata, inoltre, dalla elevata tolleranza di alcune specie alle condizioni di stress ambientale indotte da queste attività (aumento del tasso di sedimentazione, incremento della concentrazione dei nutrienti, presenza di sostanze inquinanti quali pesticidi ed insetticidi organofosforici) (Corsi et al., 2004). A titolo di esempio, per la demospongia *Hymeniacidon perlevis*, specie alquanto "rustica", tipica di ambienti chiusi e semichiusi, caratterizzati talora dalla presenza di elevati carichi inquinanti, indagini scientifiche condotte in laboratorio hanno messo in evidenza ottime *performance* di biorisanamento nei confronti di alcuni componenti del batterioplancton oltre ad elevate capacità di rimozione del carbonio organico, di accumulo e di digestione di diverse categorie batteriche e di rimozione del lindano (Fu et al., 2006; 2007). La "clearance rate" per questa specie (226.7–491.0 ml/h cm³ di tessuto di spugna) (Fu et al., 2006) è significativamente più elevata di quella riportata per altre demosponge (es. *Chondrilla nucula* CR: 0.2–1.4 ml/h cm³; *Spongia officinalis* CR: 210 ml/h ml/h cm³) (Milanese et al., 2003; Stabili et al., 2006a). In un ulteriore esperimento condotto per valutare l'effetto che l'accumulo microbiologico di *Hymeniacidon perlevis* ha sull'attività di filtrazione di *Mytilus galloprovincialis* ha evidenziato importanti potenzialità applicative nel campo della mitigazione ambientale in impianti di

molluschicoltura. Infatti, la presenza della spugna ha dimostrato un effetto positivo su *M. galloprovincialis*, riducendone l'accumulo di tutte le categorie batteriche considerate. I risultati ottenuti incoraggiano l'implementazione di sistemi di policoltura di mitili e spugne che porterebbe da una parte ad un miglioramento delle caratteristiche microbiologiche dei mitili allevati e dall'altro ad una mitigazione delle pressioni microbiologiche delle aree adibite alla molluschicoltura (Longo et al., 2016).

Esperimenti di laboratorio hanno permesso di descrivere anche per diverse specie di anellidi policheti (e.g. *Sabella spallanzanii*, *Branchiomma luctuosum*, *B. bairdi*) importanti tratti del ciclo vitale di questi organismi, oltre ad evidenziarne la capacità di ritenzione della componente batterica, della sostanza organica particolata e della sostanza organica disciolta, suggerendone un possibile impiego nel trattamento delle acque reflue, abbattimento della componente batterica e chiarificazione delle acque (Giangrande et al., 2005; Stabili et al., 2006b; 2009; 2010; Licciano et al., 2005; 2007). E' stato dimostrato, inoltre, che i policheti costituiscono un'ottima fonte di proteine animali per scopi mangimistici, nonché esche per la pesca professionale e sportiva. La componente proteica, con funzione plastica ed energetica, di rilevante necessità per tutti i tipi di pesci soprattutto nelle fasi larvali, riscontrata nei tessuti di alcune specie di policheti, è solo leggermente inferiore alla maggior parte dei mangimi. Il rapporto Omega-3/Omega-6 trovato in questi policheti inoltre, è ottimale in una valutazione dietetica-nutrizionale (Gambi et al., 1994; Giangrande & Gambi, 1998).

Infine, oltre alla "zoo-remediation" in ambiente acquatico marino, diversi studi sono stati condotti, nello stesso ambito, sulla "phyco-remediation". L'utilizzo di diverse specie di alghe come biorisanatori risale alla metà degli anni '70 e ad oggi la loro capacità di biorisanamento dei reflui degli impianti di acquacoltura, ricchi di nutrienti, è ampiamente dimostrata (Alabiso et al., 2009; Aquilino et al., 2020; Giangrande et al., 2007; Hadley et al., 2015; Lawton et al., 2013; Marinho-Soriano et al., 2011; Zhou et al., 2006). Alghe nitrofile, talvolta associate a molluschi bivalvi, sono state utilizzate con successo in attività di campo per ridurre l'eccessiva fertilizzazione delle acque di allevamento in laguna (Neori et al., 2004; Shpigel et al., 1997). Lungo la costa atlantica impianti sperimentali di allevamento di pesci (rombi e spigole) a cui sono state associate come biofiltri diverse specie di alghe, principalmente rosse Rhodophyta (*Gracilaria bursa-pastoris*, *G. gracilis*, *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata*, *Porphyra dioica*, *Asparagopsis armata*, *Gracilariopsis longissima*), ma anche alghe verdi Chlorophyta (*Ulva rotundata* e *U. intestinalis*), hanno dato risultati promettenti (Barrington et al., 2009). Buoni esempi di come le alghe migliorino le *performace* di allevamento quando adoperate in sistemi IMTA sono stati dimostrati per specie appartenenti ai generi *Gracilaria* (Abreu et al., 2011; Buschmann et al., 2001; Neori et al., 2000), *Ulva* (Bolton et al., 2009) e alghe kelp (Buschmann et al., 2010; Chopin et al., 2008).

Esperienze IMTA in sistemi di maricoltura produttivi nel Mar Mediterraneo sono state realizzate di recente nel corso di differenti progetti di ricerca. Per citarne alcuni: dai lavori pionieri del programma BIOFAQ del

2000, "INTEGRATED Multi-trophic AQUACULTURE: *A sustainable, pioneering alternative for marine cultures in Galicia*" espletato nel 2012 e "IDREEM, *Increasing Industrial Resource Efficiency in European Mariculture*" (7 Programma Quadro, 2012), ai più attuali: *Intelligent management system for integrated multitrophic aquaculture* (Cordis) e *IDMA Innovative Development of Multitrophic Aquaculture in Greece*, entrambi iniziati nel 2018. Di fatto le esperienze rimangono ancora a livello sperimentale, ma una brillante analisi anche socio-economica è presente nel progetto IDREEM. Anche lungo la costa ionica pugliese con il progetto REMEDIA Life (*REmediation of Marine Environment and Development of Innovative Aquaculture: exploitation of edible/not edible biomass*), grazie alla collaborazione di istituzioni italiane di ricerca presenti sul territorio pugliese e l'azienda Maricoltura Mar Grande di Taranto è stato sperimentato un sistema IMTA innovativo (www.remedialife.eu). Le attività di campo sono state realizzate nel Mar Grande di Taranto in un'area confinata dove insistono maggiormente gli impatti derivanti dall'attività di maricoltura costiera. Il progetto REMEDIA Life è stato sviluppato proprio per mitigare gli effetti negativi derivanti dalle attività di maricoltura sull'ambiente. Si tratta di un sistema di allevamento basato su un "nuovo" set di organismi biorisanatori che oltre ai mitili e alle macro-alghe include altri invertebrati resistenti allo stress come i policheti e le spugne, la cui azione combinata è più efficace rispetto all'uso dei soli molluschi. Tutti questi organismi allevati nelle vicinanze delle gabbie di allevamento dei pesci crescono senza alcuna aggiunta di alimento perché si "nutrono" degli scarti dell'allevamento, sottraendo il surplus organico (batteri, fitoplancton tossico e sostanza organica) ed inorganico (sali di azoto e fosforo) che andrebbero ad aumentare il carico inquinante delle acque circostanti. In questo modo uno scarto non diventa rifiuto, ma viene trasformato in biomassa potenzialmente utilizzabile. Con questo progetto è stato dimostrato che la policoltura, anziché la monocoltura, è più efficace e realizzabile in un ambiente confinato e che il sistema può condurre a un corretto sfruttamento degli scarti derivanti dall'allevamento ittico. Ad ogni ciclo produttivo oltre alle specie eduli (pesci, mitili/ostriche, macro-alghe) vengono prodotte biomasse non eduli (anellidi policheti, macro-alghe e spugne) con un elevato valore commerciale. La diversificazione della produzione può rappresentare un valore aggiunto per le imprese di acquacoltura, aprendo nuovi mercati in relazione alla commercializzazione delle biomasse non eduli. Inoltre, è stato dimostrato un biorisanamento della colonna d'acqua dell'impianto di maricoltura e dei sedimenti, con un notevole miglioramento delle condizioni ambientali (Giangrande et al., 2022; Stabili et al., 2023). Il sistema potrebbe portare, inoltre, anche ad un miglioramento delle prestazioni di allevamento con una riduzione dei rischi associati alla contaminazione batterica dei prodotti ittici e alla mitigazione degli effetti dei cambiamenti climatici nel settore dell'acquacoltura. Infine, la diffusione di pratiche di policoltura sperimentate potrebbero avere ricadute positive indirette anche sulle politiche occupazionali europee e sulla partecipazione della popolazione nei processi decisionali (discussione/confronto fra stakeholders e decision makers).

Sebbene la sperimentazione di sistemi IMTA in ambiente marino stia attraversando una fase florida e ricca di risultati, nel caso di sistemi *land-based* le ricerche sono ancora in una fase piuttosto preliminare. Quando si considera la co-coltura di organismi biorisanatori insieme a specie ittiche in sistemi semi-chiusi come quelli

land-based diverse criticità devono essere considerate. Oltre all'efficienza di filtrazione, la resistenza alla manipolazione ed il potenziale impatto sul benessere dei pesci sono fattori importanti da tenere in considerazione.

Con l'intento di implementare le conoscenze utili a progettare e potenziare sistemi di acquacoltura sostenibili rispettosi dell'ambiente, resilienti e competitivi basati sulla promozione della *Low Trophic Aquaculture* (LTA) e *Integrated Multitrophic Aquaculture* (IMTA), l'attività n. 3 realizzata nell'ambito del presente progetto ha previsto studi, in laboratorio e in campo. A tale scopo sono state effettuate ricerche, utilizzando diverse specie invertebrati marini filtratori (poriferi e policheti) e macroalghe, volte a valutare le capacità di biorisanamento nei confronti di diverse categorie di inquinanti ed è stato sperimentato un prototipo di sistema multi-trofico ad invertebrati ed alghe in un impianto di acquacoltura sperimentale *land-based*.

In particolare, nella **prima fase di laboratorio** sono state selezionate e testate le *performance* di biorisanamento di diversi organismi marini, tra cui la macroalga *Chaetomorpha linum* e la demospongia *Sarcotragus spinosulus*. Sono stati condotti test sul mantenimento in acquario di alcune specie di poriferi tra cui *Axinella cannabina* e *Aplysina aerophoba*; è stato realizzato e testato un prototipo di co-allevamento multi-trofico con spigole, poriferi e macroalghe. Infine, è stata condotta un'indagine per valutare l'interesse degli acquariofili italiani nei confronti dei poriferi e la loro disponibilità ad acquistarli come specie ornamentali.

Nella **seconda fase di sperimentazione in campo**, è stato progettato e allestito presso il centro di acquacoltura sperimentale "COISPA Tecnologia & Ricerca" un sistema di acquacoltura multi-trofica integrata (IMTA) con orate, spugne, policheti e macroalghe, replicabile in sistemi di allevamento in vasca *land-based*.

1.2 Descrizione delle specie utilizzate nella sperimentazione

Chaetomorpha linum (O.F.Müller) Kützing 1845

Phylum CHLOROPHYTA

Classe ULVOPHYCEAE

Ordine CLADOPHORALES

Famiglia CLADOPHORACEAE

Genere CHAETOMORPHA

Chaetomorpha linum (O.F. Muller) Kützing è un'alga verde filamentosa con distribuzione mondiale (Figura 1.2.A) (Guiry & Guiry, 2019). È una specie eurialina del mesolitorale, presente sia in ambiente marino che salmastro (Wollgiehn & Reinert, 1980). I talli filamentosi di *C. linum*, aventi una lunghezza compresa tra i 5 e i 35 cm, nella fase iniziale dello sviluppo si presentano adesi al substrato mediante zoidi, in seguito formano dense masse flottanti (specie bento-pleustofitica) (Wollgiehn & Reinert, 1980).

Questa specie è caratterizzata da una crescita rapida e da un'alta tolleranza ad una varietà di fattori di stress ambientali come cambiamenti di salinità, temperatura, intensità della luce, pH, ossigeno disciolto e concentrazione di nutrienti (Gordon et al., 1980; Krause-Jensen et al., 1996, 1999; McGlathery et al., 1997; Sorce et al., 2018; Taylor et al., 2001; Tsutsui et al., 2015; Xu & Lin, 2008). Queste caratteristiche ecologiche rendono *C. linum* particolarmente adatta ai fini del biorisanamento dell'acqua di mare in quanto già proposta per la bonifica di metalli pesanti in siti inquinati e per la rimozione di azoto e fosforo nell'acqua marina ricca di nutrienti (Ajjabi & Chouba, 2009; Aquilino et al., 2020; Krause-Jensen et al., 1996; McGlathery et al., 1996, 1997; Menéndez et al., 2002; Pedersen & Borum, 1996).



FEAMP
PO 2014-2020
Fondo europeo per lo
sviluppo regionale e la crescita



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 • Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

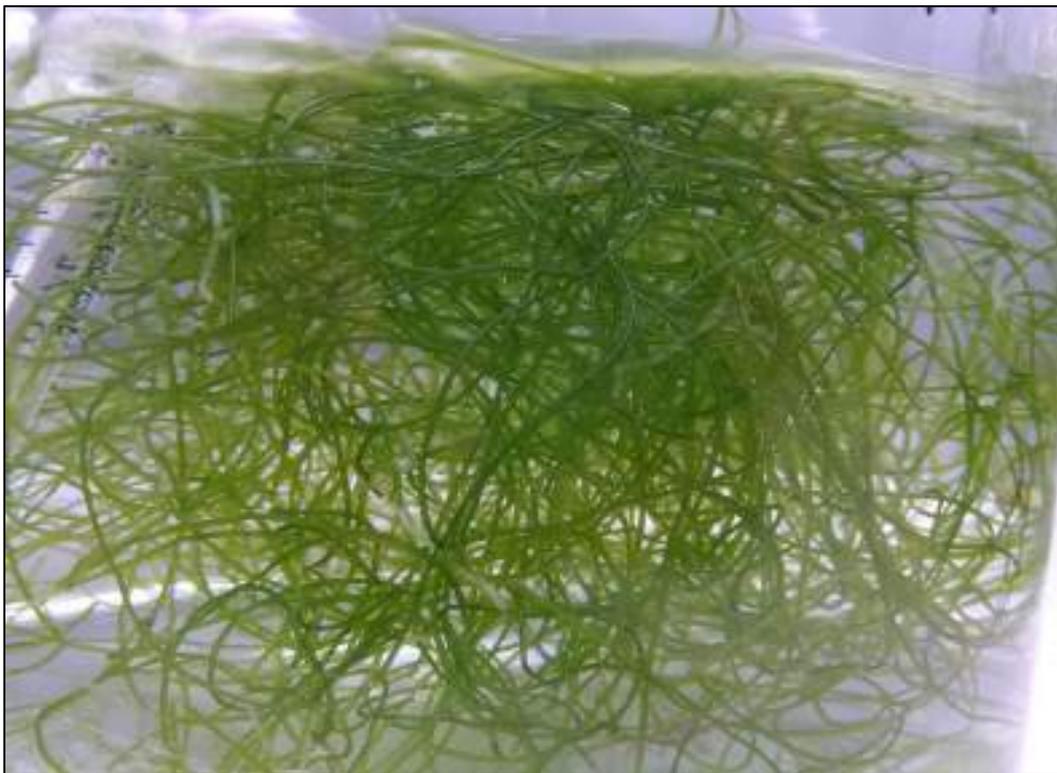


Figura 1.2.A – *Chaetomorpha linum*: macroalga in ambiente naturale (fiume Cervaro, Mar Piccolo di Taranto) (sopra) e in laboratorio (sotto) durante gli esperimenti (foto di R. Trani).

Sarcotragus spinosulus Schmidt 1862

Phylum PORIFERA

Classe DEMOSPONGIAE

Ordine DICTYOCERATIDA

Famiglia IRCINIIDAE

Genere SARCOTRAGUS

Sarcotragus spinosulus Schmidt 1862 (Figura 1.2.B) è una demospongia cornea massiccia, dalla consistenza relativamente elastica, con un diametro che può superare i 10 cm. *S. spinosulus* è comune negli ambienti costieri del Mediterraneo, presente in acque poco profonde, in un range batimetrico di 1-60 metri di profondità, su fondali rocciosi, detritici e fangosi, in comunità del coralligeno, in affioramenti carbonatici (*tegnue*), praterie di *Posidonia oceanica*, grotte e come epibionte sulle valve di *Pinna nobilis* (Corriero, 1990; Corriero et al., 2004; Manconi et al., 2013; Mercurio et al., 2001).

L'ordine Dictyoceratida è composto da quattro famiglie, tra cui Irciniidae, conosciute comunemente come spugne "keratose" in quanto il loro scheletro è costituito da una complessa matrice di fibre proteiche (spongina) anziché di elementi minerali (Hardoim & Costa, 2014).

Tra le demosponge mediterranee, questa specie è tra le più tolleranti alla luce, grazie allo strato di tessuto pigmentato che ne ricopre la superficie (pinacoderma) costituito da un gran numero di pinacociti (Figura 1.2.B) (Corriero, 1990). Studi precedenti hanno classificato i membri della famiglia Irciniidae come spugne ad alta abbondanza microbica (HMA) (Erwin, López-Legentil, & Turon, 2012; Erwin, López-Legentil, González-Pech, et al., 2012; Esteves et al., 2013; Hardoim et al., 2012; Pita et al., 2013; Weisz et al., 2007; Yang et al., 2011), evidenziando la loro capacità di ospitare un microbioma altamente denso, da 10^8 a 10^{10} cellule procariotiche per grammo di spugna (peso fresco) (Hardoim & Costa, 2014).

S. spinosulus è considerata una specie ad elevata plasticità ecologica, capace di vivere sia su falesie verticali ad alto regime idrodinamico che in baie semichiusa a bassa energia e alto tasso di sedimentazione (Corriero, 1990; Corriero et al., 2004; Mercurio et al., 2013).

Sebbene ci siano diversi rapporti sulla demosponge *S. spinosulus* in tutto il mondo, la maggior parte della ricerca si occupa delle attività antibatteriche, citotossiche e antivegetative dei metaboliti estratti da questa specie (Ben Kahla-Nakbi et al., 2010; de Rosa et al., 1995; Liu et al., 2006; Mihopoulos et al., 1999; Tsoukatou et al., 2002).

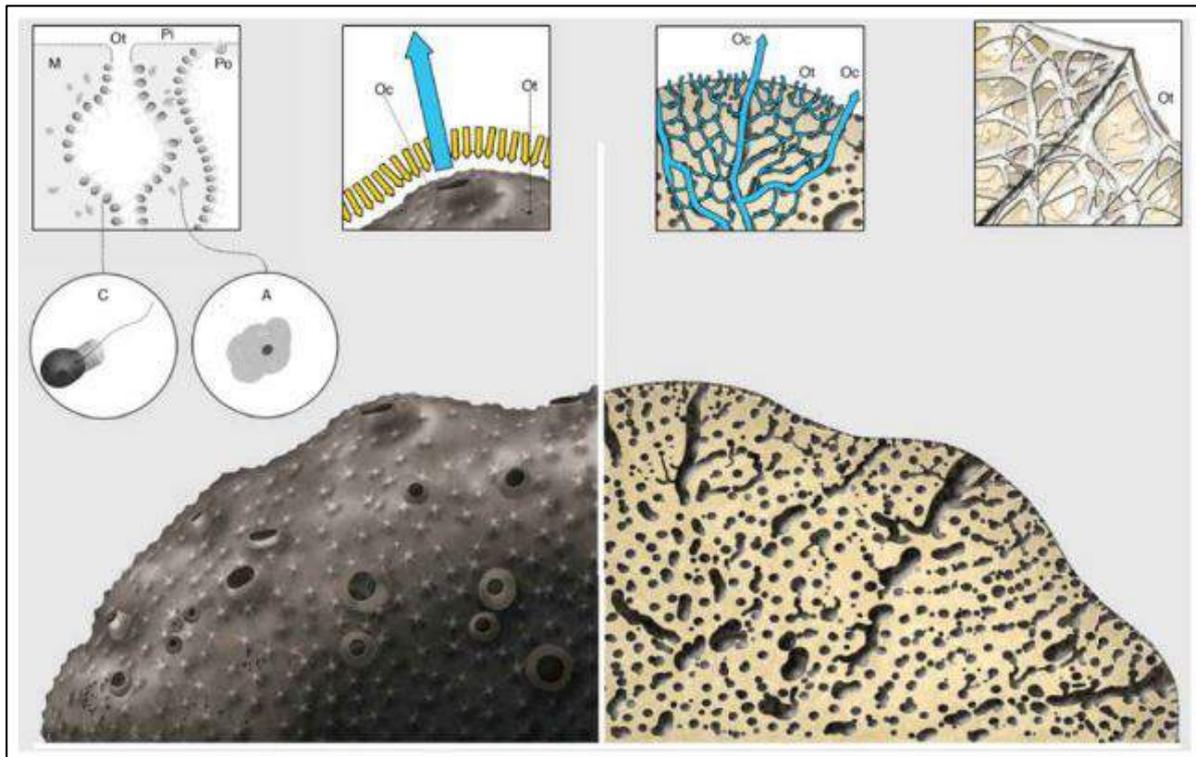


Figura 1.2.B – *Sarcotragus spinosulus*: esemplare in ambiente naturale, Golfo di Taranto, Mar Ionio settentrionale (sopra) (foto di R. Trani); immagine schematica di una demospongia appartenente alla famiglia Irciniidae: mesolio (M), ostio (Ot), pinacoderma (Pi), porocita (Po), coanociti (C); archeociti (A) e osculo (Oc); le frecce indicano il flusso dell'acqua all'interno del corpo della spugna (sotto) (Hardoim & Costa, 2014).

Hymeniacidon perlevis (Montagu, 1818)

Phylum PORIFERA

Classe DEMOSPONGIAE

Ordine HALICHONDRIDA

Famiglia HALICHONDRIIDAE

Genere HYMENIACIDON

Hymeniacidon perlevis è una specie tipica di ambienti chiusi e semichiusi, capace di vivere anche in presenza di elevati carichi inquinanti. La sua presenza è infatti segnalata in numerosi bacini mediterranei (Faro, Fusaro, Ganzirri, Marsala, Mar Piccolo di Taranto, Porto Cesareo, Venezia, Thau) (Longo et al., 2016), nonché nei grandi porti delle coste tirreniche dove può costituire ricche popolazioni (Pansini & Longo, 2003). Ampiamente distribuita lungo le coste italiane dalla superficie fino a 70 metri di profondità (Pansini & Longo, 2008), vive su substrati duri primari e secondari e su substrati incoerenti dove può raggiungere dimensioni ragguardevoli e resistere a prolungati periodi di emersione.

Dal punto di vista morfologico, *H. perlevis* si presenta di colore giallastro tendente all'arancione, può presentarsi sotto forma di sottile incrostazione oppure massiva a volte con brevi estroflessioni (Figura 1.2.C). Ha consistenza fragile e soffice ma compatta, presenta una superficie liscia o tubercolata con osculi distribuiti irregolarmente. Generalmente, quando colonizza i substrati incoerenti, include numerosi granuli di sedimento. Ha un'impalcatura scheletrica di natura silicea costituita da stili dritti, a volte con un leggero rigonfiamento sub-terminale, di dimensioni comprese tra 200-450 µm di lunghezza e 3-12 µm di spessore.

Questa spugna si caratterizza per la presenza di un simbiocortex superficiale costituito da uno strato di cianofitiche simbionti (Sarà & Liaci, 1964). Il tessuto fortemente lacunoso ospita inoltre una ricca fauna di macroorganismi simbionti (Sarà, 1966). Come in altri organismi bentonici, la concentrazione di cianobatteri simbionti è regolata oltre che da fattori ecologici abiotici come l'illuminazione (Bavestrello et al., 1992), anche da sostanze ad azione citotossica (metaboliti secondari), prodotte in tracce dalla spugna, che tra le varie funzioni regolano anche la proliferazione sia dei microrganismi che quella dei macroinvertebrati e dei vegetali epi- ed endobionti (Hay, 1996; Ridley et al., 2005).

Il ciclo riproduttivo di *H. perlevis*, studiato in esemplari delle coste spagnole, ha evidenziato una marcata stagionalità nella produzione di elementi riproduttivi (Uriz, 1982). *H. perlevis* è una specie vivipara in cui il periodo di massima emissione larvale, di tipo parenchimella, coincide con i mesi di agosto e settembre (Uriz, 1982).

Nell'ambito dell'estrazione di biomolecole da organismi marini, *H. perlevis*, insieme alle altre specie appartenenti al genere *Hymeniacidon*, produce metaboliti secondari a forte azione antitumorale e attivi sul sistema nervoso centrale (Clement et al., 2004; Pettit et al., 2004; Xue et al., 2004; Zheng et al., 2006) che trovano mercato nell'industria farmaceutica. Inoltre, recenti ricerche hanno messo in evidenza le sue ottime

performance di biorimediazione nei confronti del batterioplancton totale, anche in impianti di acquacoltura *land-based* (Fu et al., 2006; 2007; Longo et al., 2022).

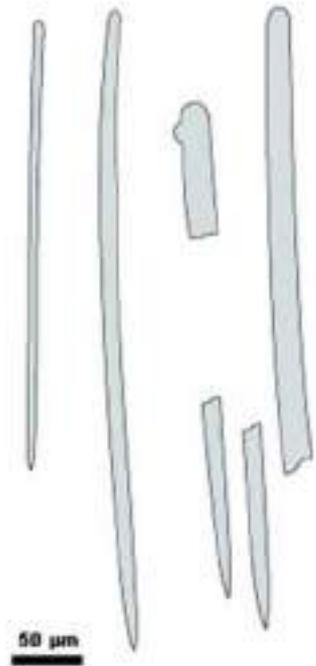


Figura 1.2.C – *Hymeniacidon perlevis*: esemplare parzialmente emerso, fotografato nel Secondo Seno del Mar Piccolo di Taranto (sinistra); elementi scheletrici: stili (destra).

Aplysina aerophoba (Nardo, 1833)

Phylum PORIFERA
 Classe DEMOSPONGIAE
 Ordine VERONGIIDA
 Famiglia APLYSINIDAE
 Genere APLYSINA

Aplysina aerophoba (Figura 1.2.D) è una spugna appartenente alla famiglia delle Aplysinidae. Diffusa in tutto il Mediterraneo, *A. aerophoba* vive su fondali mediamente illuminati, in particolare tra i rizomi della prateria di *Posidonia oceanica*, tra le alghe fotofile (che amano la luce), all'ingresso di grotte semi-sommerse o anche nei fondali misti con sabbia e ciottoli (Manconi et al., 2013). *A. aerophoba* ha l'aspetto di un aggregato compatto di strutture cilindriche o meglio digitiformi (diametro 1-2 cm e lunghezza 3-8 cm) di colore giallo acceso, riunite alla base da uno strato comune di diametro sino a 30 cm, con un osculo sulla parte terminale. Vive in simbiosi con alghe azzurre che si insediano all'interno delle cellule dello strato esterno della spugna. Negli esemplari giovani, le strutture digitiformi appaiono saldate tra loro anche nelle parti vicine all'apice. Il suo scheletro è costituito da fibre di spongina, spesso con midollo centrale, che confluiscono anche nelle tipiche protuberanze (conuli), ma manca di inclusioni e spicole (Figura 1.2.D). All'aria, questa specie annerisce gradualmente, passando prima per una tonalità azzurro-verdastra a cui il nome latino di *aerophoba* (= che ha paura dell'aria). La causa di questo viraggio risiede in cellule particolari, gli amebociti, che contengono un pigmento che si modifica quando viene a contatto con l'ossigeno (Manconi et al., 2013). Alcune ricerche di laboratorio, inoltre, sembra abbiano dimostrato che questa spugna, insieme ad *A. cavernicola*, possiede particolari proprietà antibatteriche. Il motivo è legato al fatto che i tessuti contengono sostanze tossiche, tra cui composti contenenti Bromo e Zolfo, che renderebbero anche queste specie immangiabili o velenosi per molti organismi marini. Nonostante la tossicità, costituisce uno dei principali alimenti della ciprea mediterranea (*Luria lurida*). *A. aerophoba* si riproduce asessualmente attraverso la produzione di "propaguli", ossia piccoli prolungamenti che si slargano all'estremità a forma di goccia. Questi ultimi rimangono collegati alle digitazioni tramite un sottilissimo peduncolo, che distaccandosi cadono sul fondale e danno origine ad un nuovo esemplare.

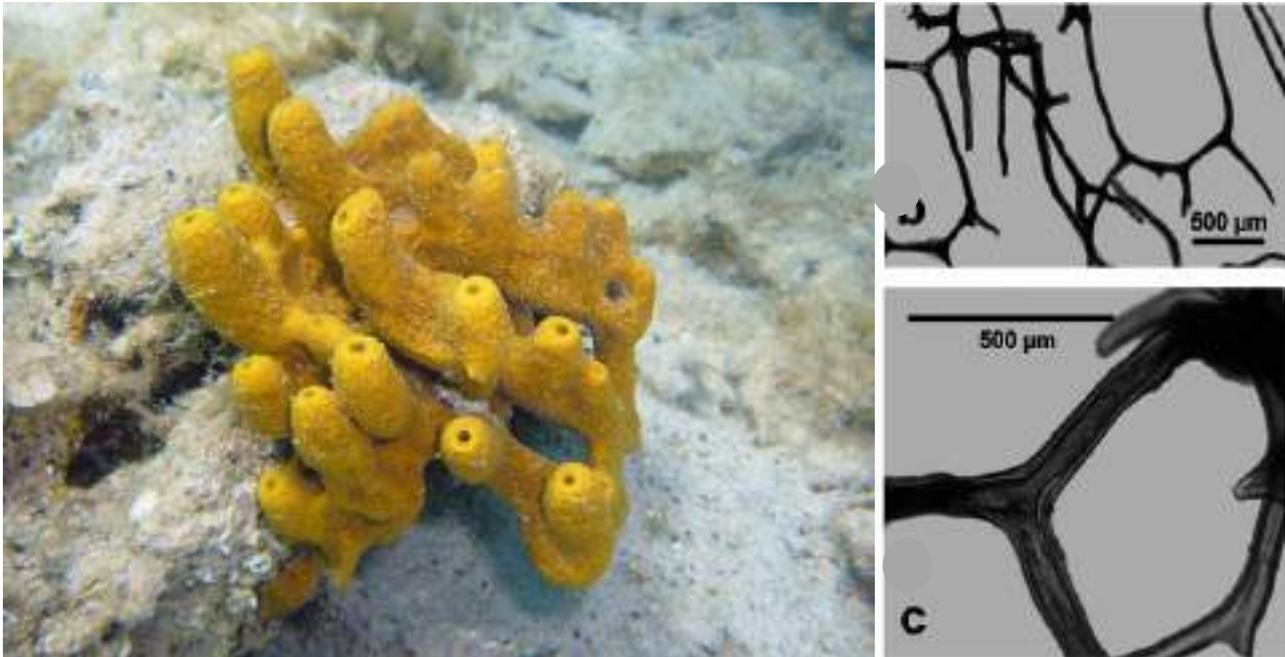


Figura 1.2.D – *Aplysina aerophoba*: esemplare in ambiente naturale (sinistra); elementi scheletrici: fibre di spongina (destra) (Manconi et al., 2013, modificato).

Sabella spallanzanii (Gmelin, 1791)

Phylum ANNELIDA

Classe POLYCHAETA

Ordine SABELLIDA

Famiglia SABELLIDAE

Genere SABELLA

Sabella spallanzanii (Figura 1.2.E) è un verme marino sedentario, comunemente noto come “spirografo”, ampiamente presente in tutto il Mar Mediterraneo, può vivere sia in aree riparate poco profonde fortemente eutrofiche (ad esempio i mari interni, i porti, gli impianti di acquacoltura) che in aree più esposte e oligotrofiche fino a 30 metri di profondità (Currie et al., 2000). Questa specie vive all’interno di un tubo pergamenaceo e fangoso, ancorato a fondi duri o sabbiosi, o a substrati artificiali, e può sporgere fino a 40 centimetri sopra il sedimento e infossarsi in profondità fino a 10 centimetri (Knight-Jones & Perkins, 1998). Morfologicamente presenta un corpo diviso in torace e addome caratterizzato da una corona branchiale spiralata, che aprendosi all’apice del tubo si apre fino a raggiungere un diametro di 10-15 centimetri assolvendo alla funzione respiratoria e soprattutto a quella alimentare mediante la filtrazione (Figura 1.2.E). Essa è costituita da una serie di filamenti chiamati “radioli” con espansioni laterali, dette “pinnule”, che presentano una fine ciliatura dorsale con duplice funzione: aumentare la superficie adibita alla filtrazione e creare, con il loro movimento, una micro-corrente, per convogliare le particelle alimentari verso la bocca, situata alla base della corona stessa (Clapin & Evans, 1995). Si tratta infatti di un organismo filtratore, si nutre principalmente di plancton e di sostanza organica disciolta (Clapin, 1996). Quando l’anellide è disturbato si ritira nel tubo chiudendone l’apertura. Il tubo è spesso ricoperto da incrostazioni o organismi sessili e il colore del ventaglio varia dal bianco all’arancio, al rosso-marrone (Knight-Jones & Perkins, 1998).

S. spallanzanii è una specie ermafrodita proterandrica ed il rapporto fra sessi è quasi sempre di 1:1 (Giangrande, 1997). La durata media della vita è stata stimata di circa 4 anni. Inoltre, questo anellide mostra grandi capacità rigenerative sfruttabili come potenziale riproduzione asessuale. Tipica è la rigenerazione della corona branchiale che spesso sia autotomizza se il verme non è in condizioni ottimali e per la quale occorre circa un mese per la completa rigenerazione. Da risultati emersi da recenti studi si evince che gli individui di *S. spallanzanii*, se distaccati dal loro sito originale, possono riposizionarsi su nuovo substrato, a condizione che esso non sia mobile, grazie alla secrezione di un muco che permette ad essa di riattaccarsi (Raganato et al., 2001).

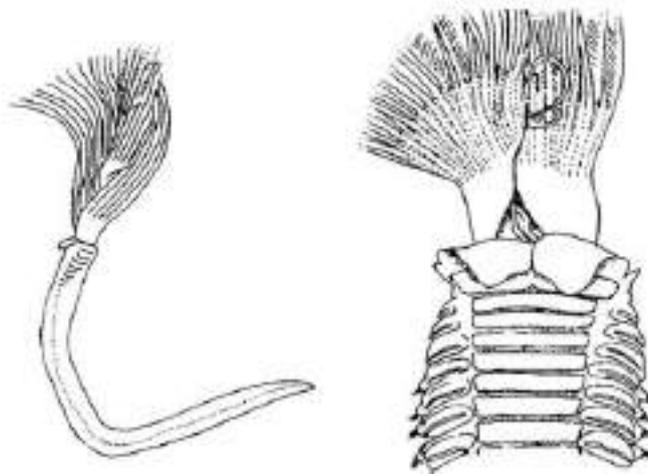


Figura 1.2.E – *Sabella spallanzanii*: esemplare in ambiente naturale, Mar Piccolo di Taranto (sopra) (foto di Angelo Salvatore); Raffigurazione della morfologia del corpo e del capo con la corona branchiale (sotto) (Knight-Jones & Perkins, 1998, modificato).

Sparus aurata Linnaeus, 1758

Phylum CHORDATA

Classe TELEOSTEI

Ordine PERCIFORMES

Famiglia SPARIDAE

Genere SPARUS

Sparus aurata (Figura 1.2.F), comunemente nota come orata, è un pesce osseo eurialino di interesse commerciale comune nei mari italiani. Il nome deriva dalla caratteristica striscia di color oro che il pesce mostra fra gli occhi. *S. aurata* è presente in tutto il bacino del Mediterraneo e lungo le coste dell'Atlantico orientale, dalla Guinea e Senegal fino al Mar Cantabrico e al sud delle Isole Britanniche. È presente anche nelle Isole Canarie (Suau & López Gómez, 1976). È una specie marina, molto comune su fondali rocciosi, ricchi di alghe e *Posidonia oceanica*, anche se non è raro trovarla su fondali sabbiosi o fangosi. Gli individui giovani hanno abitudini più costiere, vivendo a profondità inferiori ai 30 metri, anche se gli adulti possono raggiungere profondità di 100-150 metri. Pur essendo una specie gregaria, vive solitamente solitario o in piccoli gruppi. Tuttavia, durante le migrazioni riproduttive possono formare gruppi di migliaia di individui (Suau & López Gómez, 1976).

S. aurata presenta il profilo del capo convesso e la mandibola leggermente più breve della mascella superiore. Sulla parte anteriore di ciascuna mascella sono presenti da 4 a 6 grossi denti caniniformi, seguiti da 3-5 serie di denti molariformi superiori e 3-4 inferiori (Figura 1.2.F). Il complesso apparato dentale le consente di rompere con facilità le dure valve di molluschi e crostacei. La pinna dorsale è unica con 11 raggi spinosi e 12-13 molli. La linea laterale include 75-85 squame. Il dorso è grigio-azzurro ed i fianchi argentei con sottili linee grigie longitudinali. Una banda nera e una dorata sono interposte fra gli occhi. Una caratteristica distintiva è la presenza di una macchia nera sull'opercolo, all'inizio della linea laterale. La lunghezza massima dell'orata è 70 cm, ma la più comune è tra i 20 e 50 cm; può raggiungere un peso di 10 kg circa. Le orate sono ermafrodite proterandriche, durante la prima fase della loro vita sono sessualmente maschi, raggiunti i 2 anni di età (33-40 cm di lunghezza) avviene l'inversione sessuale con la regressione dell'apparato riproduttivo maschile e lo sviluppo delle gonadi femminili. Nella maggior parte dei casi, l'80% della popolazione subirà l'inversione sessuale, diventando femmina mature, mentre il restante 20% della popolazione resterà di sesso maschile. Questo rapporto varia in funzione dei parametri ambientali e sociali. La riproduzione avviene in più cicli di ovodeposizione principalmente tra novembre e febbraio (Suau & López Gómez, 1976).



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
Fondo Europeo per lo Sviluppo
Rurale - la crescita e la prosperità



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 • Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

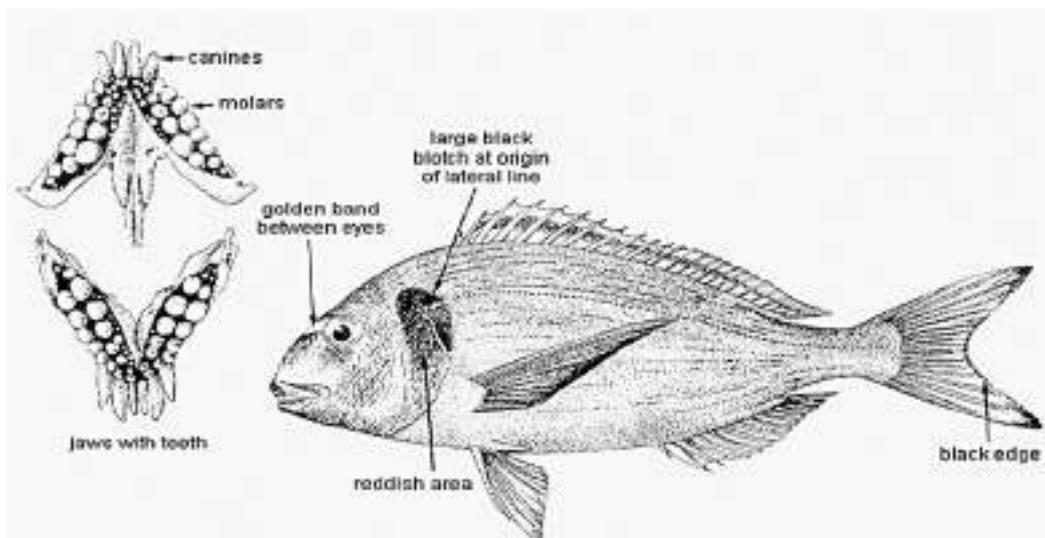


Figura 1.2.F – *Sparus aurata*: esemplare in ambiente naturale (sopra) (foto di Antonio Colacino); morfologia e particolare di mascella e mandibola (sotto) (Crespi & New, 2009, modificato).

Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)

Phylum CHORDATA

Classe TELEOSTEI

Ordine PERCIFORMES

Famiglia MORONIDAE

Genere DICENTRARCHUS

Dicentrarchus labrax (Figura 1.2.G), nota comunemente come spigola o branzino, è una specie di pesce osseo marino e d'acqua salmastra della famiglia Moronidae. Presenta un corpo affusolato, leggermente compresso con profilo dorsale leggermente incurvato e ventrale quasi rettilineo. Il capo è grande con muso appuntito, la bocca grande è situata in posizione mediana, leggermente protrattile e munita di piccoli denti su entrambe le mascelle con denti presenti su vomere, palatino e lingua. L'opercolo è caratterizzato dalla presenza di due spine rivolte verso la coda (Louisy, 2020). Gli individui di *D. labrax* presentano un forte dimorfismo sessuale in riferimento alla taglia, le femmine dopo il terzo anno si accrescono maggiormente rispetto ai maschi, raggiungendo una taglia massima di 110 cm e 12 kg. La livrea presenta una colorazione grigia sul dorso, argentea sui fianchi e biancastra sul ventre. Può tuttavia assumere una colorazione verdastra in rapporto alla tipologia di habitat in cui vive. Presenza di una macchia nera sfumata sulla parte superiore dell'opercolo. Gli esemplari giovanili sono caratterizzati da una lieve punteggiatura nerastra disposta irregolarmente lungo i fianchi nella metà superiore del corpo, che scompare dopo il primo anno di vita (Louisy, 2020).

D. labrax è una specie gregaria, soprattutto durante i primi anni di vita, ed eurialina, vive su fondali rocciosi, sabbiosi e fangosi spogli e vegetati generalmente tra 2 e 30 metri di profondità, potendo tuttavia spingersi anche su batimetriche prossime ai 200 metri. Spesso penetra in lagune ed estuari, risalendo il cuneo salino delle foci dei fiumi anche per parecchi chilometri adattandosi facilmente ad acque salmastre e quasi dolci. Si tratta di una specie gonocorica e il periodo riproduttivo si realizza tra Gennaio e Marzo (Pérez-Ruzafa & Marcos, 2014).

Specie macrobentivora ed ittiofaga, si nutre in massima parte di crostacei, molluschi, e piccoli pesci quali latterini, gobidi e mugilidi (Riley et al., 2011).



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
PO 2014-2020
Fondo europeo per lo
sviluppo regionale - la crescita e la coesione



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI SALI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023



Figura 1.2.G – *Dicentrarchus labrax*: esemplare in ambiente naturale (foto di Alberto Biondi).



FEAMP
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 • Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

CAPITOLO 2

FASE 1: SPERIMENTAZIONE DEL PROTOTIPO DI SISTEMA DI ALLEVAMENTO MULTITROFICO AD INVERTEBRATI E ALGHE IN LABORATORIO

2.1	Mantenimento in laboratorio di potenziali biorisanatori	127
2.2	Sperimentazione delle <i>performance</i> di <i>bioremediation</i> in laboratorio	136
2.2.1	Valutazione dell'attività di filtrazione da parte della spugna keratosa <i>Sarcotragus spinosulus</i> Schmidt, 1862 (Porifera, Demospongiae)	
2.2.2	Valutazione della capacità di rimozione del surplus dei nutrienti dall'acqua di mare da parte della macroalga <i>Chaetomorpha linum</i> (O.F. Müller) Kützing, 1845 (Chlorophyta, Ulvophyceae)	
2.3	Progettazione e sperimentazione del prototipo di <i>bioremediation</i> in laboratorio	150
2.4	Verifica del gradimento delle specie “biofiltro”	159
2.4.1	Conduzione di un sondaggio per valutare il gradimento delle specie “biofiltro” nel settore acquariofilo	

2.1 Mantenimento in laboratorio di potenziali biorisanatori

Raccolta e mantenimento in acquario di diverse specie di poriferi

Diversi esemplari delle specie di poriferi *Aplysina aerophoba* e *Axinella cannabina* sono stati raccolti lungo la costa adriatica della Puglia. Le spugne sono state prelevate da operatori subacquei in immersione avendo cura di staccare gli esemplari con un frammento di substrato al fine di minimizzare lo stress della raccolta. Una volta raccolte, le spugne sono state trasportate presso il Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente dell'Università di Bari in contenitori con acqua di mare refrigerata ed areata. Una volta in laboratorio, gli esemplari sono stati tagliati in esemplari di dimensioni simili omogenee, posizionati su una struttura di supporto con maglie 1x1cm e collocati in due acquari da 60 L per 5 giorni a 16 °C per l'acclimatazione prima dell'esperimento e per verificare segni di stress, sofferenza o cattive condizioni di salute (osservabili per esposizione dello scheletro o cambio di colore improvviso). Contestualmente è stata monitorata la cicatrizzazione dei tagli effettuati per i frammenti.

In totale sono stati posti in allevamento 36 espianti per ogni specie. Nel corso di un esperimento della durata di 40 giorni sono stati monitorati la sopravvivenza ed il peso degli espianti di spugne alimentati con diversi ceppi microalgali liofilizzati e le concentrazioni dei nutrienti.

Preparazione dell'esperimento

Sono stati allestiti 24 acquari (Figura 2.1.A) da 8 L con acqua marina artificiale preparata utilizzando sale marino (Red Sea Salt) e successivamente filtrata attraverso un filtro con porosità di 0,45 µm. Per l'intera durata dell'esperimento, la temperatura è stata mantenuta a 17 °C, la salinità a 36 ‰, il pH a 8,2 e l'ossigeno disciolto a 6 ppm. Questi parametri sono stati monitorati continuamente utilizzando una sonda multi-parametrica (Hanna Instruments, HI9829). L'illuminazione è stata settata su un fotoperiodo con un regime luce-buio 12:12 h. L'intensità luminosa è stata settata in un intervallo fra 700 e 1100 lux per gli acquari contenenti *A. aerophoba* e fra 70 e 90 lux per *A. cannabina*. Le differenze corrispondono alle condizioni ecologiche delle due specie in natura, con la seconda specie distribuita a profondità maggiori della prima. Il 25% dell'acqua in ogni acquario è stata sostituita ogni settimana.

In ogni acquario, tre esemplari selezionati casualmente, sono stati posizionati su un supporto posto ad 1 cm dal fondo e mantenuti immobili per monitorarli individualmente (Figura 2.1.B).



Figura 2.1.A – Allestimento dei 24 acquari in camera termostata.

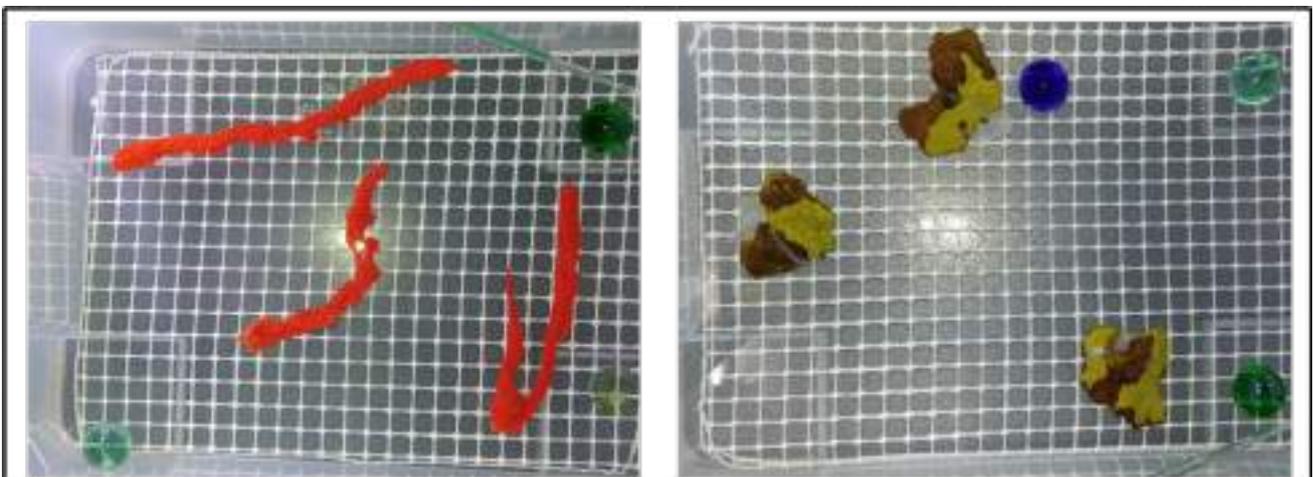


Figura 2.1.B – Allestimento di acquari sperimentali con tre esemplari di *Axinella cannabina* (sinistra) e tre di *Aplysina aerophoba* (destra).

Preparazione del cibo e regimi alimentari

L'alimentazione delle spugne in allevamento (Figura 2.1.C) è stata basata su tre microalghe liofilizzate di diverse dimensioni e composizione nutritiva: *Isocrisis aff. Galbana* (4-8 μm), *Nannochloropsis* sp. (2-4 μm) e *Thalassiosira weissflogii* (10-50 μm). Un quarto regime consisteva in una miscela delle tre microalghe in

rapporto 1:1:1. Ciascuno dei quattro mangimi (da ora in poi I, N, T e M) è stato preparato a tre diverse concentrazioni (10^3 , 10^4 e 10^5 cellule/mL, abbreviate come 3, 4 e 5, rispettivamente) secondo il rapporto cellule-grammo ed i protocolli forniti dal produttore. Tutte le concentrazioni sono state controllate utilizzando una camera di Neubauer. Ogni acquario è stato alimentato tre volte a settimana inoculando 48 mL di soluzione contenente le alghe.



Figura 2.1.C – Fase di alimentazione dei poriferi posti in allevamento.

Monitoraggio degli esemplari in allevamento

La sopravvivenza degli esemplari è stata valutata visivamente in base a cambiamenti di colore e della superficie (esposizione del tessuto interno o cambi improvvisi di colore). Gli esemplari morti sono stati prontamente rimossi e fissati in formaldeide al 4% per future analisi. All'inizio e alla fine dell'esperimento, sono stati misurati il volume e il peso bagnato degli esemplari per quantificare la crescita finale. Allo stesso modo, una foto dell'area occupata da ciascun frammento è stata scattata dalla parte superiore di ciascun acquario. Tali immagini sono state acquisite una volta alla settimana per calcolare l'area superficiale proiettata (PSA) utilizzando Photoquad. Il metodo di valutazione adottato minimizza lo stress per gli esemplari e ha dimostrato una correlazione lineare con peso e volume

Il livello di nutrienti (NO_2^- , NO_3^- e PO_4^{3-}) è stato monitorato una volta alla settimana utilizzando kit reagenti Hanna Instrument (HI717, HI782, HI764) prima dei cambi di acqua programmati.

Risultati: salute e sopravvivenza degli esemplari

Tutti gli esemplari di spugna hanno cicatrizzato le superfici di taglio durante il periodo di acclimatazione e sono quindi state avviate alla sperimentazione. Alcuni frammenti di *A. aerophoba* si sono attaccati spontaneamente al supporto, mostrando buone condizioni di salute. Alla fine dell'esperimento in alcuni esemplari di

entrambe le specie, il tessuto scheletrico era esposto ed erano evidenti macchie scure, segnali di sofferenza e di perdita di biomassa.

Nel complesso, la sopravvivenza di *A. aerophoba* è stata del 58% e del 94% quella di *A. cannabina* (Figura 2.1.D). La mortalità è stata osservata principalmente nella seconda metà dell'esperimento in tutti gli acquari tranne che nell'acquario alimentato con T5 (*Thalassiosira weissflogii* ad una concentrazione di 10^5 cellule/mL), dove tutti e tre gli esemplari di *A. aerophoba* sono morti nella prima settimana. Gli esemplari sono stati sostituiti ed è stato cambiato il regime alimentare (da tre volte a settimana a una volta a settimana), portando gli esemplari in buone condizioni fino alla fine della sperimentazione.

Ad esclusione dell'unica vasca in cui è stata osservata la morte di tutti gli esemplari, per tutte le altre sono state notate differenze nella sopravvivenza in relazione ai regimi alimentari testati. Gli esemplari di *A. aerophoba* alimentati con *Nannochloropsis* sp. (qualsiasi concentrazione) hanno restituito i valori più elevati di sopravvivenza (77,77%) rispetto alle altre alghe ed alla seconda spugna allevata (Figura 2.1.E). Riguardo alle concentrazioni, anche se molto simili, i mangimi meno concentrati hanno mostrato una leggera migliore performance in media. Nel complesso, i regimi alimentari migliori sono stati N3, I3 e M5 (e T5 dopo la sostituzione degli esemplari); mentre la sopravvivenza è diminuita all'aumentare delle concentrazioni di microalghe N e I, l'opposto è stato osservato per T e M (Figura 2.1.F). Per quanto riguarda *A. cannabina*, due esemplari alimentati con il regime M5 hanno manifestato sofferenza, con ampi tessuti necrotici scuri, mentre nel resto degli acquari la sopravvivenza è stata del 100% (figura 2.1.E).

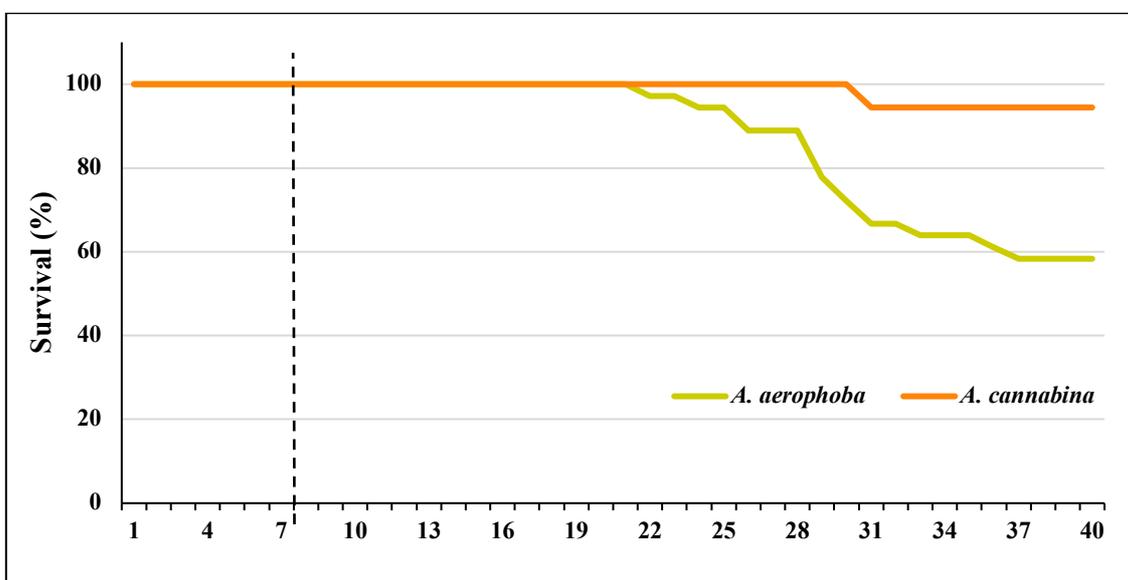


Figura 2.1.D – Sopravvivenza totale degli esemplari (%) durante i 40 giorni di sperimentazione. La linea tratteggiata rappresenta la morte e la sostituzione dei tre esemplari con il regime alimentare T5.

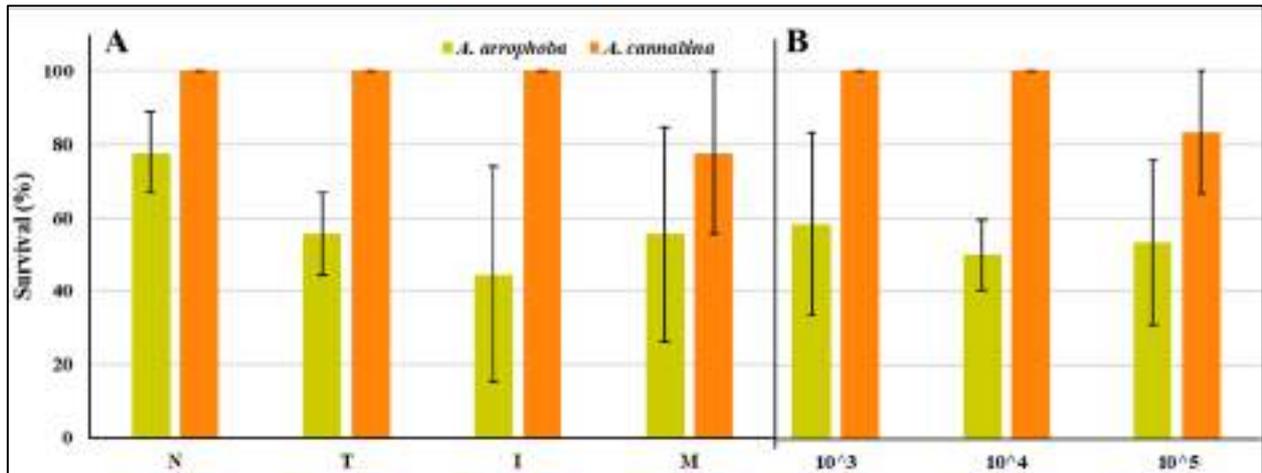


Figura 2.1.E – Valori medi di sopravvivenza (\pm SE) in base alla specie di microalghe (A) e alla concentrazione utilizzata (in cellule/mL, B). Per *A. aerophoba*, i valori medi di sopravvivenza di T e 10^5 includono valori prima e dopo la sostituzione.

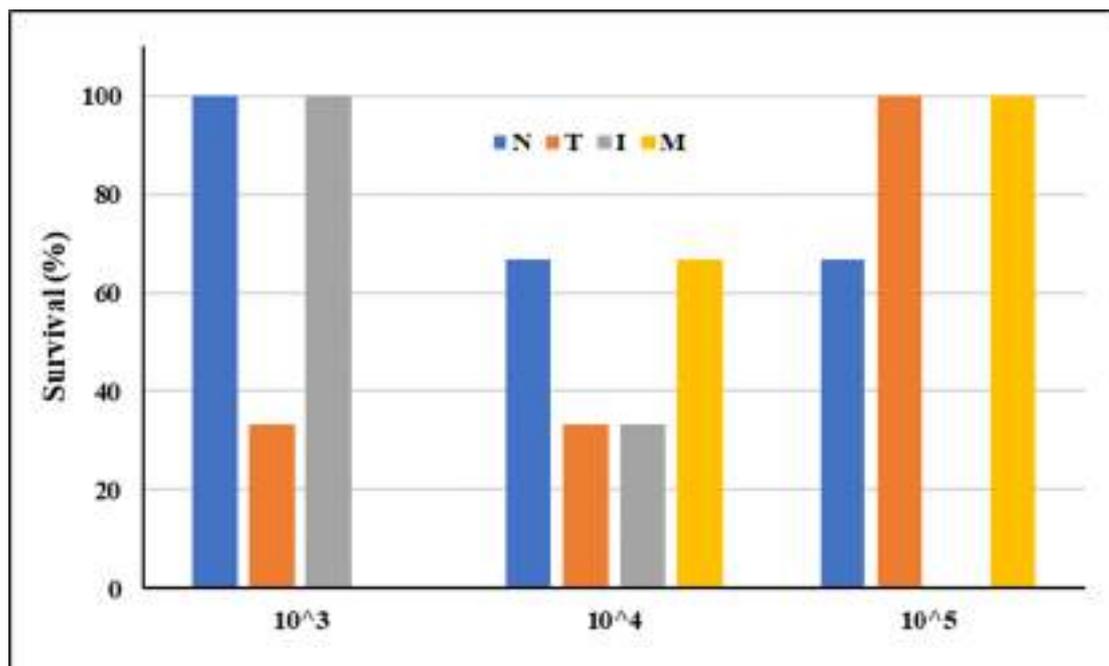


Figura 2.1.F – Sopravvivenza degli esemplari di *A. aerophoba* in base ai dodici regimi alimentari utilizzati nell'esperimento. Si notano diverse tendenze in base all'aumento delle concentrazioni (in cellule/mL). La sopravvivenza di T5 si basa sugli esemplari dopo la sostituzione.

Risultati: tassi di crescita

Dopo 40 giorni di allevamento, gli esemplari di *A. aerophoba* e *A. cannabina* hanno avuto un incremento del peso medio pari a circa l'88% e al 108% del peso iniziale, rispettivamente. Anche se non significativamente diversi, M e I sono risultate essere le microalghe che hanno determinato le migliori prestazioni in termini di

crescita in entrambe le specie di poriferi, mentre la loro concentrazione non sembra influenzarne la crescita (Figura 2.1.G).

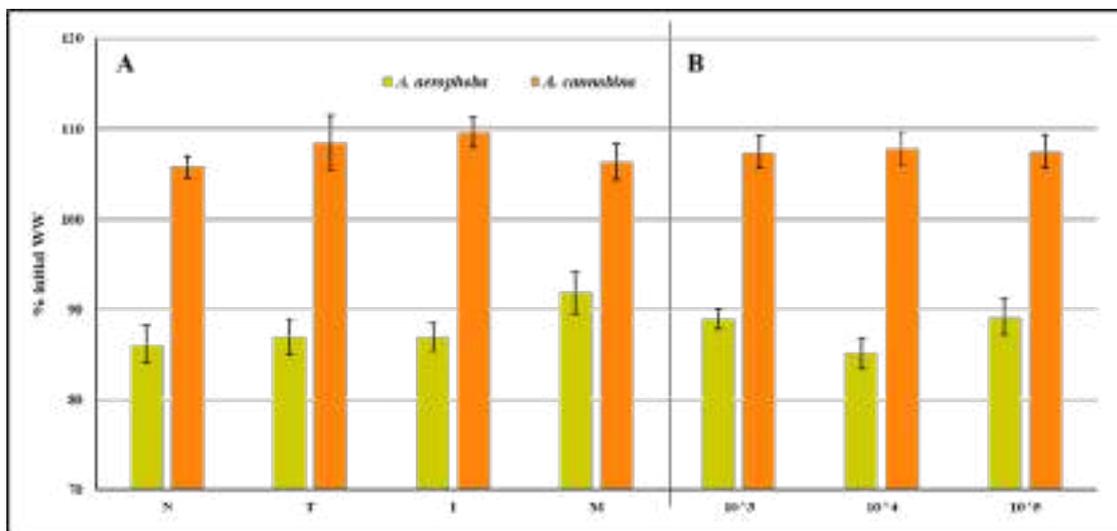


Figura 2.1.G – Percentuale di peso bagnato finale (\pm SE) degli esemplari alimentati con diverse specie di microalghe liofilizzate (A) e concentrazioni (in cellule/mL, B).

Risultati: analisi dei nutrienti

In media, gli acquari con *A. cannabina* hanno mostrato valori più elevati di nitriti e nitrati rispetto ad *A. aerophoba*, indipendentemente dalle microalghe o concentrazioni utilizzate, ad eccezione del fosfato, dove i livelli per entrambe le specie erano simili (Figura 2.1.H). Per *A. cannabina*, il regime alimentare con *T. weissflogii* ha determinato il maggiore livello di nutrienti, mentre per *A. aerophoba* i valori più alti sono risultati derivare dalla miscela di microalghe in termini di sali di azoto e dal *T. weissflogii* in termini di fosfati. Tuttavia, entrambe le specie di spugne hanno mostrato livelli più alti di NO₃⁻ e PO₄³⁻ quando sono stati utilizzati regimi più concentrati, mentre per il NO₂⁻, le concentrazioni più basse e più alte di microalghe hanno causato i valori più elevati dei nutrienti (Figura 2.1.H). Nel complesso, è stata osservata una tendenza ad un aumento nel tempo della concentrazione di nutrienti in tutti gli acquari. È interessante notare che alla fine dell'esperimento, in tutti gli acquari alimentati con T e M, i valori più elevati dei nutrienti sono stati registrati a concentrazioni di 10⁵ cellule/mL, mentre in quelli alimentati con N e I le concentrazioni più basse (solitamente 10³ cellule/mL) hanno favorito un maggiore rilascio di nutrienti (Figure 2.1.I,J).

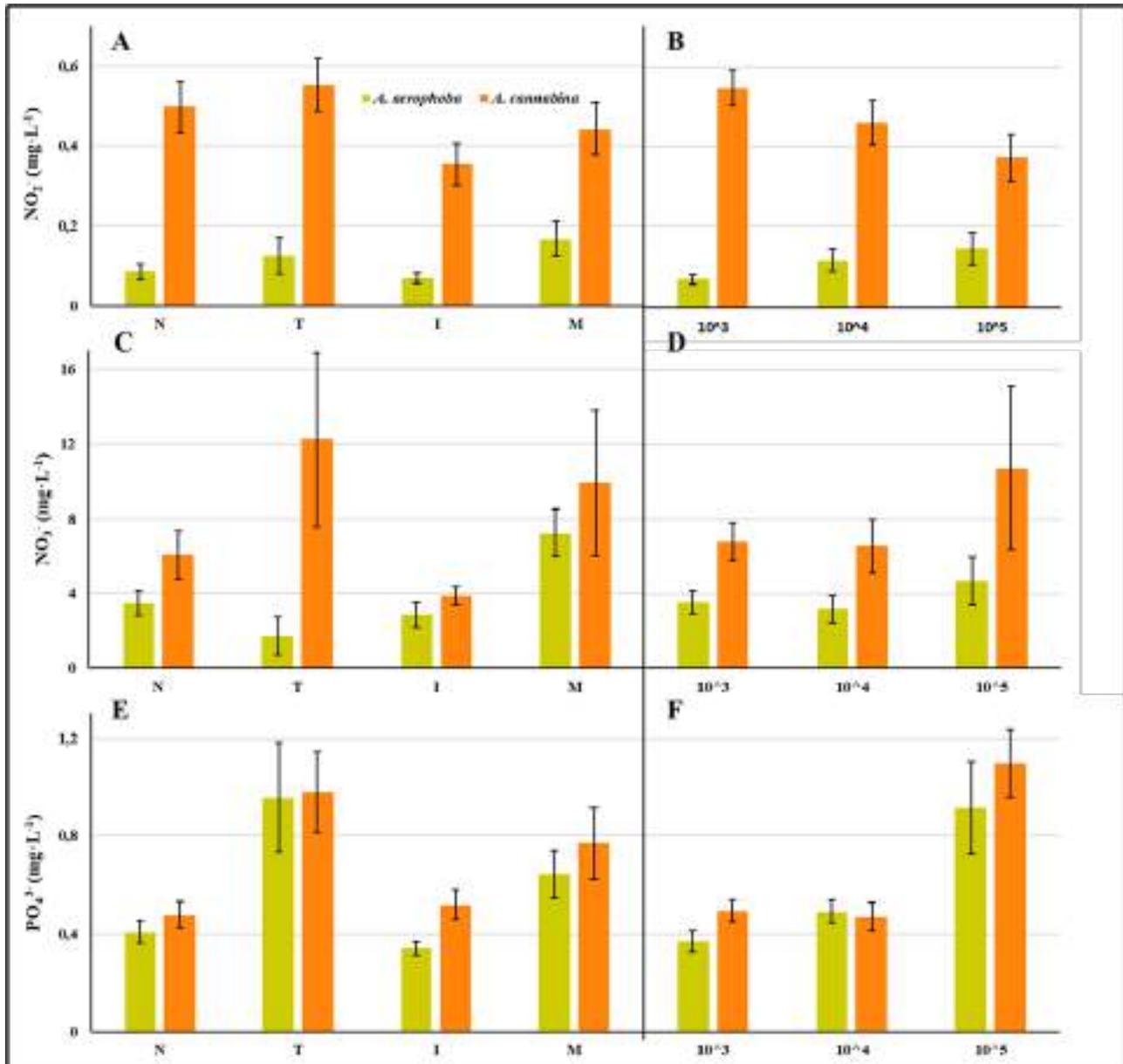


Figura 2.1.H – Livelli medi di nutrienti (\pm SE) negli acquari durante l'esperimento in base alla specie di microalghe liofilizzate somministrate (A, C ed E) o alla concentrazione (in cellule/mL; B, D e F).

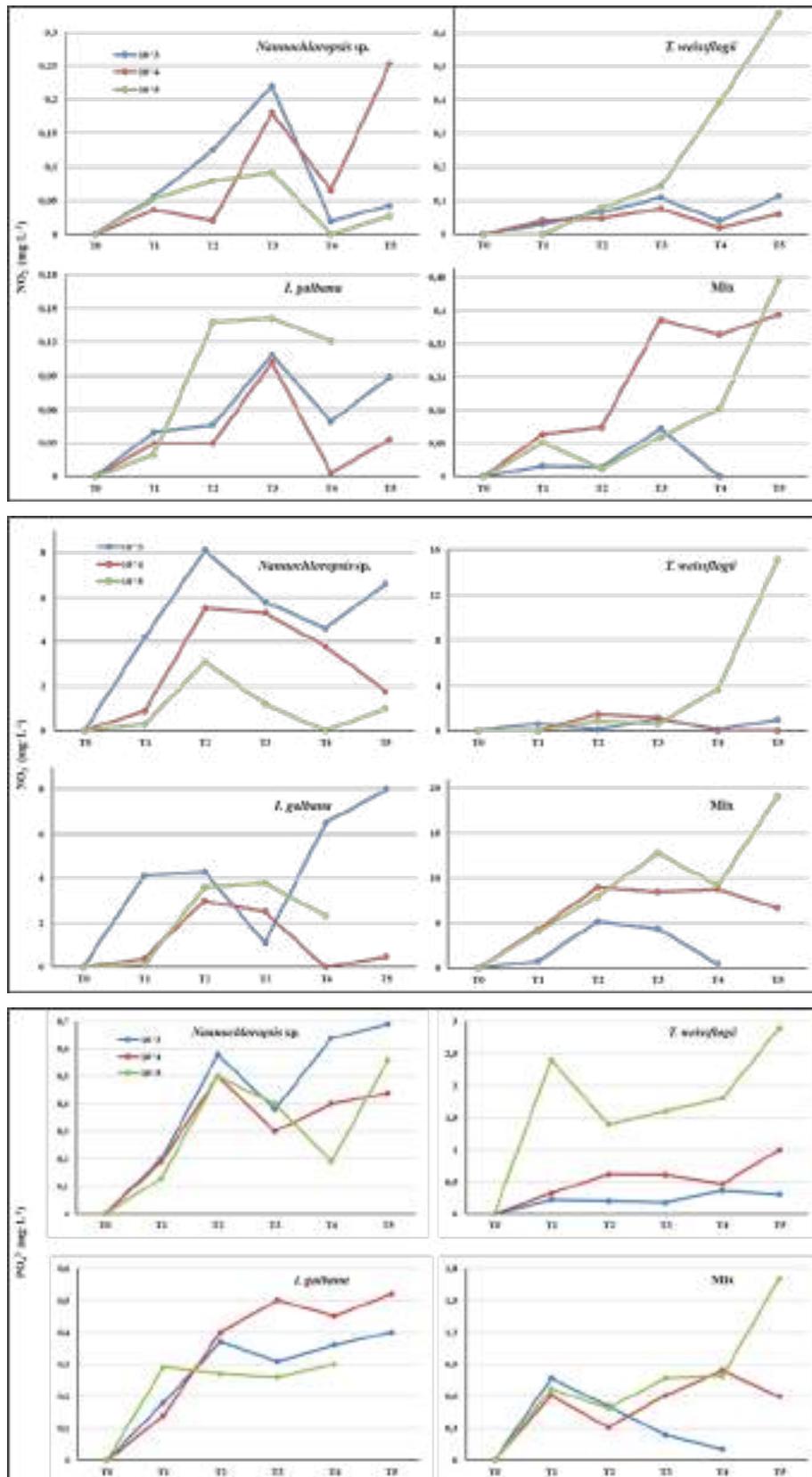


Figura 2.1.I – Livelli di nitriti, nitrati e fosfati negli acquari con *A. aerophoba* in base alle microalghe somministrate nello studio.

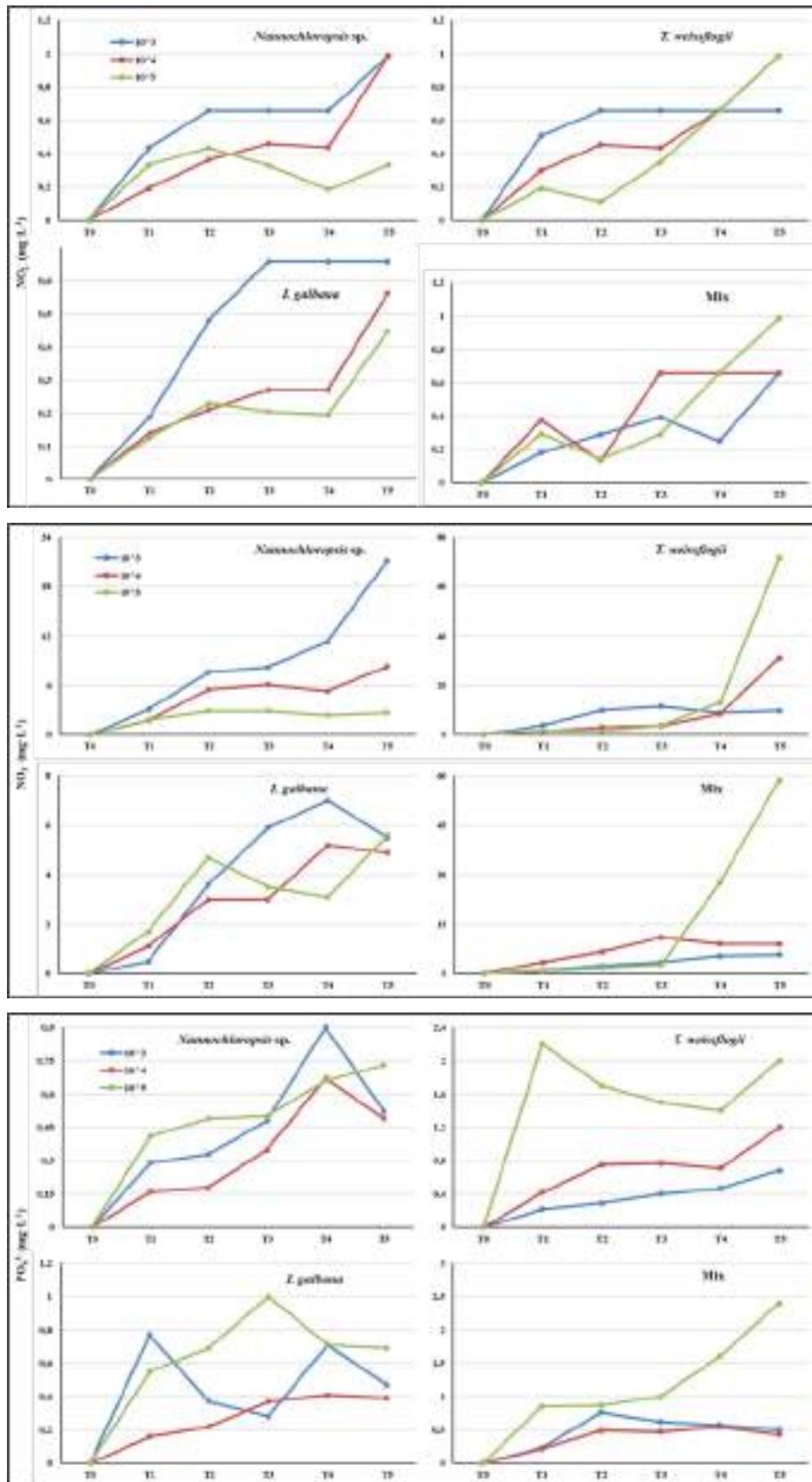


Figura 2.1.J – Livelli di nitrati, nitriti e fosfati negli acquari con *A. cannabina* in base alle microalghe somministrate nello studio.

2.2 Sperimentazione delle *performance di bioremediation in laboratorio*

2.2.1. *Valutazione dell'attività di filtrazione da parte della spugna keratosa *Sarcotragus spinosulus* Schmidt, 1862 (Porifera, Demospongiae)*

La capacità della spugna *Sarcotragus spinosulus* di ridurre la carica microbica è stata studiata in esperimenti condotti in laboratorio, stimando il tasso di clearance e l'efficienza di ritenzione nei confronti del batterio alofilo Gram-negativo *Vibrio parahaemolyticus* (famiglia Vibrionaceae) al fine di valutare la sua idoneità come organismo biorisanatore microbico all'interno di sistemi di acquacoltura sostenibili.

*Raccolta degli esemplari di *Sarcotragus spinosulus**

Gli esemplari di *S. spinosulus* sono stati raccolti nel Mar Grande di Taranto in immersione con ARA (Auto-Respiratore ad Aria) a una profondità compresa tra 5 e 10 m ($T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sono stati prelevati staccando delicatamente ogni individuo dal substrato selezionando quelli appartenenti allo stesso *range* dimensionale. Gli esemplari raccolti sono stati immediatamente trasportati in laboratorio, all'interno di borse termiche, dove sono stati sciacquati con acqua di mare al fine di rimuovere eventuali residui di sedimento e organismi del *macrofouling*. In laboratorio, gli esemplari sono stati posti a stabulare per due giorni in un acquario contenente 100 L di acqua marina sintetica filtrata (AMSF) (filtro con pori da $0,22\text{ }\mu\text{m}$) all'interno di una camera a temperatura controllata ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$), prima dell'inizio degli esperimenti (Figura 2.2.A); l'acqua contenuta nell'acquario è stata sostituita due volte con nuova AMSF al fine di evitare la contaminazione dell'acqua da batteri e particolato.



Figura 2.2.A. Apparato di filtrazione, montato con filtro $0,22\text{ }\mu\text{m}$, utilizzato per filtrare l'acqua marina sintetica (AMSF) adoperata durante gli esperimenti (sinistra); alcuni degli esemplari di *S. spinosulus* durante la fase di stabulazione in laboratorio (destra) (foto di R. Trani).

Disegno sperimentale

L'esperimento di laboratorio ha riguardato lo studio dell'attività di filtrazione della demospongia *Sarcotragus spinosulus* a due diverse concentrazioni di *Vibrio parahaemolyticus*.

Il ceppo CIRPS 4253 *V. parahaemolyticus*, appartenente alla collezione del laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente dell'Università degli Studi di Bari (Ottaviani et al., 2013), è stato utilizzato per preparare AMSF con 10^4 CFU mL⁻¹ (concentrazione C1) e 10^6 CFU mL⁻¹ (concentrazione C2). CIRPS 4253 è stato posto a crescere in brodo di coltura Luria Bertani 3% NaCl (LB, OXOID, Milano, Italia) e incubato *over night* (O/N) a 37°C. La concentrazione di batteri vitali (CFU mL⁻¹) nella coltura O/N è stata misurata mediante conta vitale standard su terreno di crescita, in dettaglio, aliquote di 0.1 mL della coltura batterica, diluita in serie, sono state seminate piastre contenenti LB 3%NaCl e incubate O/N a 37°C, successivamente le colonie batteriche, cresciute su ogni piastra, sono state contate e le concentrazioni (CFU mL⁻¹) calcolate rispetto al fattore di diluizione e al volume seminato.

L'esperimento di filtrazione è stato eseguito in triplicato, allestendo un totale di 30 contenitori in vetro (10 per ogni esperimento) collocati in una camera a temperatura controllata impostata a 20°C (temperatura media stagionale dell'acqua di mare durante il periodo di raccolta delle spugne) con aereazione continua e illuminazione artificiale (16:8 luce/buio, intensità luminosa 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e riempiendo ciascun contenitore con 3L di AMSF (Figura 2.2.B).

Dei dieci barattoli previsti per ogni esperimento, sei prevedevano l'inserimento di un esemplare di spugna ciascuno, due dei quali asepticamente inoculati con un'aliquota della coltura CIRPS 4253 O/N per raggiungere la concentrazione C1 (contenitore trattamento, T_C1) e due inoculati per raggiungere la concentrazione C2 (contenitore trattamento, T_C2); gli ultimi due contenitori sono stati adoperati tal quale e utilizzati come controllo per valutare l'eventuale rilascio, da parte della spugna, di batteri appartenenti alla famiglia Vibrionaceae (*Sponge Control*, SC). I restanti quattro barattoli sono stati allestiti senza le spugne: due dei quali contenenti solo AMSF (*Negative Control*, NC) e due inoculati con la coltura CIRPS 4253 O/N alle concentrazioni finali C1 e C2, e utilizzati come controllo positivo alle due concentrazioni batteriche (*Positive Control*, PC: rispettivamente PC_C1 e PC_C2) (Figura 2.2.C).

L'esperimento ha avuto una durata di 48 ore ed i campionamenti di aliquote di acqua di mare per la valutazione della carica batterica in ogni contenitore sono stati effettuati a: 0, 2, 4, 24 e 48 ore (rispettivamente: t0, t1, t2, t3, t4).

Il benessere degli esemplari di spugna è stato monitorato durante gli esperimenti osservando la superficie della spugna e le aperture degli osculi. Al termine degli esperimenti, il volume di ciascun esemplare è stato misurato per mezzo di un Beaker graduato (125 ± 28 mL, valore medio \pm ES), successivamente le spugne sono state poste in stufa, all'interno di fogli di alluminio, a 100 °C per 24 ore per la determinazione del loro peso secco (DW, valore medio $44,8 \pm 10$ g).



Figura 2.2.B – Alcuni dei contenitori di vetro allestiti per l'esperimento di filtrazione della spugna *S. spinosulus* nei confronti del batterio patogeno *V. parahaemolyticus*.

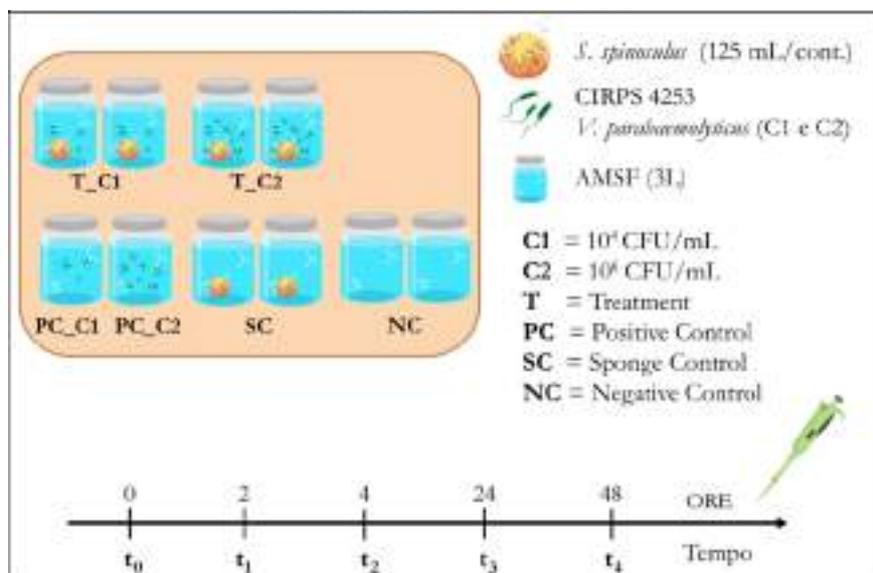


Figura 2.2.C – Disegno sperimentale implementato per lo studio di filtrazione, in laboratorio, della spugna *S. spinosulus*.

Analisi microbiologiche

La densità batterica è stata misurata in ogni tempo di campionamento, seminando 0,1 mL dei campioni d'acqua di mare, e diluizioni seriali, su Tiosolfato-Citrato-sali Biliari-Saccarosio (TCBS, OXOID, Milano, Italia) agar con il 2% di NaCl, mezzo selettivo e differenziale per *Vibrio* alofili. Le piastre sono state incubate a

temperatura ambiente (22 ± 2 °C) per 24 ore. Le colonie di colore giallo (considerate *V. parahaemolyticus*) cresciute su ogni piastra sono state contate e le CFU mL⁻¹ calcolate rispetto al fattore di diluizione e al volume del campione seminato. I dati sono stati riportati come valore medio \pm errore standard (ES) di ogni set di contenitori.

Stima del tasso di ritenzione della componente batterica in S. spinosulus

Ad ogni tempo di campionamento, l'efficienza di ritenzione (R) è stata calcolata come percentuale della differenza nelle concentrazioni batteriche, con la seguente equazione:

$$R (\%) = 100 * \left[\frac{(C_{t0} - C_{tx})}{C_{t0}} \right]$$

dove C_{t0} è la concentrazione batterica iniziale e C_{tx} è la concentrazione batterica in ogni tempo di campionamento successivo (Stabili et al., 2006).

Il valore della *Clearance rate* (CR) è stato stimato utilizzando l'equazione fornita da Coughlan (Coughlan, 1969), che fornisce una misura indiretta del volume d'acqua V ripulito dalle cellule batteriche per unità di tempo T e peso W (*weight*):

$$CR = \frac{\ln \left(\frac{C_{t0}}{C_{tx}} \right) V}{TW}$$

I dati sono stati riportati come CR peso-specifici ed espressi in millilitri per ora per grammo di peso secco (*Dry Weight*, DW) di spugna (mL h⁻¹ g DW⁻¹).

Analisi statistica

Tutti i dati raccolti durante gli esperimenti sono stati calcolati come variabili dipendenti utilizzando PERMANOVA in un approccio simile all'ANOVA parametrico. I test PERMANOVA univariati sono stati eseguiti su matrici di similarità di Bray-Curtis con 9999 permutazioni (Anderson, 2001). I fattori "concentrazione batterica" (C, 3 livelli) e "tempo" (t, 5 livelli) sono stati utilizzati per rilevare differenze nella carica batterica, efficienza di ritenzione (R) e *Clearance rate* (CR). Ogni interazione è stata analizzata individualmente utilizzando test PERMANOVA univariati con lo stesso disegno sperimentale. Se necessario, per eseguire le analisi sono stati utilizzati dati trasformati in una matrice di somiglianza Bray-Curtis con 9999 permutazioni (Anderson, 2001). Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il software PRIMER v6 + PERMANOVA (Anderson et al., 2008).

Risultati sulla capacità di filtrazione della spugna

Il benessere delle spugne valutato visivamente, sia durante il periodo di stabulazione (due giorni) sia durante le 48 ore di esperimento, non ha messo in evidenza alcun segno di stress del pinacoderma tantomeno delle aperture osculari.

Il trend delle concentrazioni batteriche (CFU mL⁻¹ ± ES) nel corso dell'esperimento per ognuna delle due concentrazioni di *Vibrio parahaemolyticus* testate (C1 = 1,0×10⁴ e C2 = 1,0×10⁶) nei trattamenti (presenza delle spugne, T_C1, T_C2, SC) e nei contenitori controllo (assenza delle spugne, PC_C1 and PC_C2, NC) sono mostrate in Figura 2.2.D.

Durante l'esperimento, le variazioni delle concentrazioni batteriche (CFU mL⁻¹) sono state influenzate dalle concentrazioni iniziali dei batteri (C), dal tempo (t) e dalla loro interazione (t x C) (Permanova univariata, pseudo-F = 4,5983, df = 8, p = 0,001). Due ore dopo l'inizio dell'esperimento (t1), la concentrazione del *V. parahaemolyticus* nei contenitori trattamento era significativamente inferiore rispetto a quella riscontrata nei contenitori controllo corrispondenti (T_C1 = 6,7±1,4×10³, T_C2 = 3,2 ± T_C2 0,6×10⁵ e PC_C1 = 1,2±0,1×10⁴, PC_C2 = 1,0±0,1 × 10⁶) (Pairwise test, PC_C1 > T_C1; PC_C2 > T_C2). Questa relazione è stata mantenuta durante l'esperimento e le differenze tra trattamenti e controlli sono continuamente aumentate. Il confronto a coppie Pairwise in funzione della concentrazione del *Vibrio* ha evidenziato una significativa diminuzione nel tempo in entrambi i trattamenti (Pairwise test, TC_C1: t0 > t1 > t2 > t3 >> t4 e TC_C2: t0 >> t1 = t2 >> t3 >> t4). Alla fine dell'esperimento, dopo 48 ore (t4), le concentrazioni del *Vibrio* hanno mostrato la più alta diminuzione nei contenitori trattamento, raggiungendo valori che erano tre (T_C1 = 67±7) e quattro (T_C2 = 383±41) ordini di grandezza inferiori rispetto alle concentrazioni iniziali. La concentrazione del *Vibrio* è aumentata nei contenitori controllo (PC_C1 e PC_C2), raggiungendo alla fine dell'esperimento lo stesso valore medio (4,9±0,1×10⁶). Nel controllo negativo (NC) non è stata osservata alcuna crescita batterica durante l'esperimento. Per quanto riguarda i contenitori controllo SC (solo spugna), la presenza di batteri è stata osservata a partire da t1, ma con concentrazioni batteriche molto basse (da 63±23,0 a t1, a 25±2,9 a t4) e comunque inferiori rispetto agli altri contenitori (5 ordini di grandezza inferiori ai PC), senza registrare successivi aumenti.

L'efficienza di ritenzione (R) della spugna *S. spinosulus* nella rimozione dei batteri, calcolata come variazione percentuale della concentrazione batterica tra due tempi di campionamenti successivi, è stata influenzata dalla concentrazione iniziale di batteri (C), dal tempo (t) e dalla loro interazione (t x C) (Permanova univariata, df = 3, Pseudo-F = 7,3315, p = 0,01). Differenze significative sono state evidenziate sia tra le due concentrazioni di *Vibrio* che in funzione del tempo. Al tempo t1 (due ore dall'inizio dell'esperimento), R ha mostrato valori più bassi nei contenitori T_C1 rispetto ai T_C2 (t1: rispettivamente 33,3% e 68,5%; Pairwise test, T_C2 >> T_C1) e valori prossimi al 100% al tempo t4 (48 ore) (rispettivamente 99,35% e 99,72% a C1 e C2) (Figura 2.2.E). Quest'ultimo valore è stato raggiunto per i campioni T_C2 già al t3 (24 ore) (Pairwise test, t3: T_C1 << T_C2; t4: T_C1 = T_C2).

I valori della *Clearance*, calcolati considerando il volume di acqua processato dalla spugna in un certo periodo di tempo (CR: mL h⁻¹g DW⁻¹ ± ES), sono riportati in Figura 2.2.E. I valori massimi di *Clearance rate* sono stati registrati nei tempi t2 per T_C1 (16,6±0,9) e t1 per T_C2 (45,0±4,1) (Pairwise test, t x C, sul fattore t: T_C1: t1 = t2 >>t3 < t4; T_C2: t1 >> t2 = t3 < t4). Il valore medio calcolato dopo 48 ore dall'inizio dell'esperimento (t4) è stato di 7,4±0,2 per la concentrazione più bassa del *V. parahaemolyticus* testata (T_C1) e di 8,7±0.9 alla concentrazione più alta (T_C2). Il rapporto tra i trattamenti (T_C1 e T_C2) è sovrapponibile a quello dell'efficienza di ritenzione. L'analisi statistica ha rivelato una relazione significativa in funzione del tempo (t) e dell'interazione tra il tempo e la concentrazione batterica iniziale (C) (Permanova univariata, df = 3, Pseudo-F= 3,5463, p= 0,009).

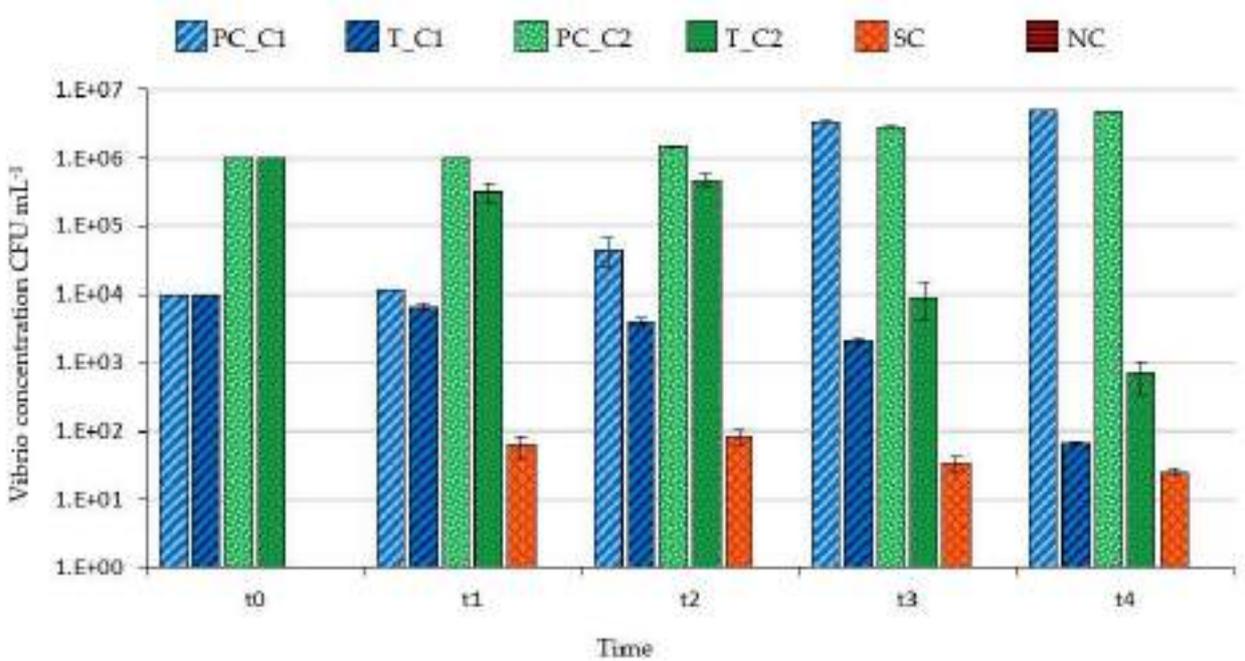


Figura 2.2.D – Concentrazioni di *V. parahaemolyticus* (valore medio ± ES) nell'acqua di mare misurate nei contenitori controllo e trattamento per ognuna delle concentrazioni batteriche testate (C1 e C2).

PC_C1= controllo positivo alla concentrazione C1; T_C1= trattamento alla concentrazione C1; PC_C2= controllo positivo alla concentrazione C2; T_C2= trattamento alla concentrazione C2; SC= Spugna Controllo (solo spugna); NC= controllo negativo.

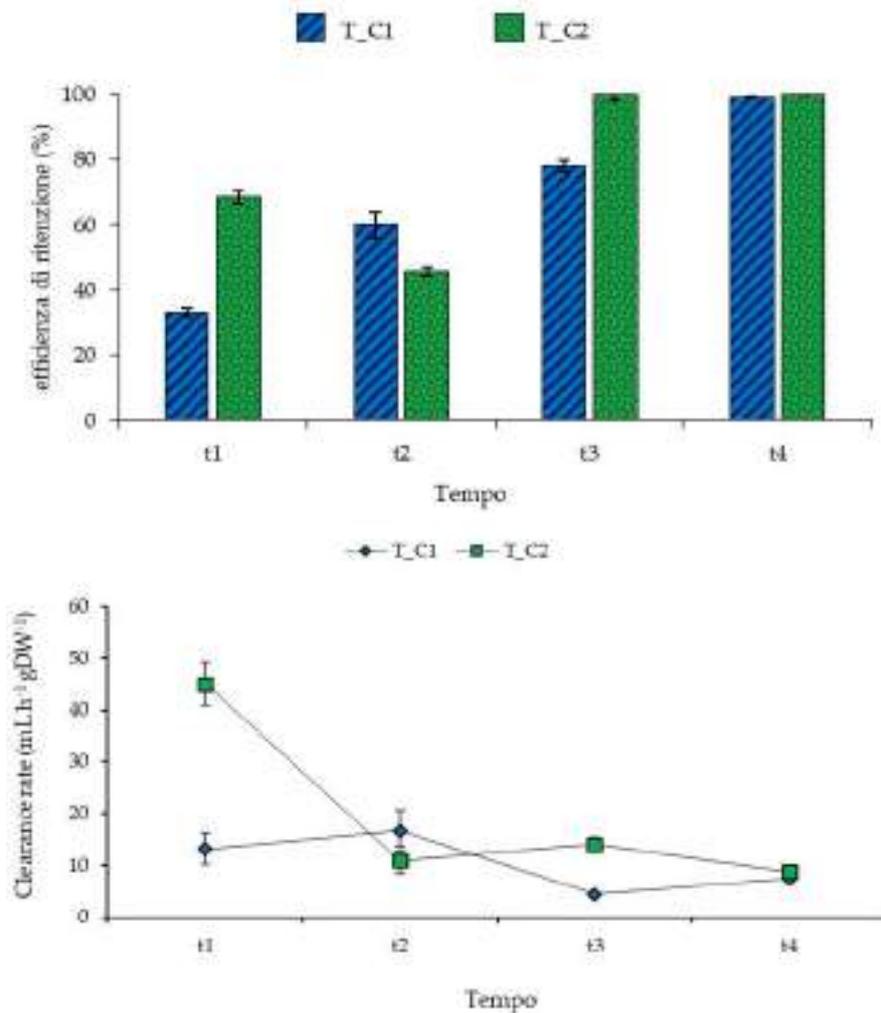


Figura 2.2.E – Andamento nel tempo dell'efficienza di ritenzione R (sopra) e della Clearance rate (sotto) di *S. spinosulus* registrato per entrambe le concentrazioni del *V. parahaemolyticus* testate (C1 e C2). Le barre di errore indicano l'errore standard.

Discussione dei risultati ottenuti

Le performance di filtrazione di *S. spinosulus* ottenuti nel presente studio, dimostrano che questa specie rappresenta un valido candidato nel biorisanamento microbico, dimostrando un'efficiente capacità di rimozione e controllo di *V. parahaemolyticus* dall'acqua di mare in condizioni di laboratorio. Questo risultato è piuttosto interessante a causa dell'elevata patogenicità di alcune specie di *Vibrio* nei confronti sia dell'uomo che delle specie allevate. *V. parahaemolyticus*, infatti, è un agente patogeno umano ampiamente presente in ambienti marini, spesso isolato da una varietà di frutti di mare tra cui bivalvi, crostacei e pesci (Su & Liu, 2007).

I valori dell'efficienza di ritenzione (R) riscontrati nell'esperienza rappresentano un ulteriore incoraggiamento all'uso della spugna *S. spinosulus* in acquacoltura. I risultati ottenuti hanno mostrato, infatti, valori di R fino al 99,72%, in linea con altri studi condotti su altre specie di spugne che hanno riportato un'efficienza di ritenzione che varia dal 70 al 99% per piccole particelle sospese come *Vibrio* spp. (Duckworth et al., 2006;

Pile et al., 1996; Reiswig, 1971; Ribes et al., 1999; Stabili et al., 2006; Topçu et al., 2010). Il presente esperimento dimostra che l'efficienza di ritenzione è aumentata gradualmente raggiungendo il valore massimo dopo 48 ore per la concentrazione C1 e dopo 24 ore per C2. Quest'ultimo dato evidenzia come la ritenzione di cellule di *Vibrio* da parte di *S. spinosulus* sia positivamente correlata alla loro maggiore disponibilità nei contenitori sperimentali.

La *Clearance rate* (CR), intesa come misura della diminuzione del "cibo" in funzione del tempo, del volume dell'acqua ripulita e delle dimensioni della spugna (Coughlan, 1969; Riisgård, H., Larsen, P., 1995), stimata in entrambe le concentrazioni di *Vibrio* testate, dimostra le rispettabili *performance* di *S. spinosulus*. Il valore CR più elevato è stato registrato alla massima concentrazione di *Vibrio* (C2) con valori compresi tra 8,7 e 45,0 mL g DW⁻¹ h⁻¹. Il valore più alto, osservabile già due ore dopo l'inizio dell'esperimento, evidenzia che, come per R, la maggiore disponibilità di *Vibrio* influisce positivamente sul tasso di variazione della concentrazione batterica per questa spugna. *S. spinosulus*, alla sua massima attività di filtrazione, è in grado di ripulire un volume d'acqua pari a 17 volte il suo volume in un'ora.

2.2.2. Valutazione della capacità di rimozione del surplus dei nutrienti dall'acqua di mare da parte della macroalga *Chaetomorpha linum* (O.F. Müller) Kützinger, 1845 (Chlorophyta, Ulvophyceae)

La capacità di rimozione dei nutrienti da parte della macroalga *Chaetomorpha linum* è stata dimostrata in esperimenti di laboratorio di breve durata (24 ore) (Aquilino et al., 2020). Nel presente studio è stato condotto in un esperimento di laboratorio per un periodo complessivo di osservazione di 12 giorni ed effettuando una doppia somministrazione di nutrienti. L'obiettivo è di valutare la capacità di questa specie di sottrarre nutrienti in tempi prolungati, per una possibile applicazione in un modello di biorisanamento multi-trofico.

Raccolta delle biomasse algali di Chaetomorpha linum

Le biomasse algali di *C. linum* sono state raccolte nel secondo Seno del Mar Piccolo (Figura 2.2.F). Presso i laboratori del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente dell'Università di Bari dai talli filamentosi di *C. linum* sono stati rimossi gli epifiti. I talli quindi sono stati sottoposti ad un periodo di stabulazione di sette giorni, in acqua marina sintetica (AMS) oligotrofica, ovvero priva di ammonio e fosfati e a basso contenuto di nitrati (1,30±0,01 mg L⁻¹), con aerazione delicata e in condizioni di temperatura controllate (21±1°C).



Figura 2.2.F – Raccolta delle biomasse algali dal secondo seno del Mar Piccolo di Taranto (foto di R. Trani).

Disegno sperimentale

L'esperimento è stato condotto in triplicato nelle medesime condizioni del periodo di stabulazione. Sono state definite due fasi sperimentali, ogni fase iniziava con la somministrazione dei nutrienti: la prima fase è durata cinque giorni con tre tempi di campionamento (0, 24, 96 ore), la seconda ha avuto una durata di otto giorni con sei tempi di campionamento (0, 24, 48, 72, 96, 168 ore), per una durata complessiva di 12 giorni di osservazione (Figura 2.2.G).

Sono stati allestiti sei barattoli di vetro da 3 L contenenti 1 L di AMS oligotrofica e 10 g di peso fresco di *C. linum* ciascuno. Soluzioni concentrate dei sali cloruro di ammonio (NH_4Cl), nitrato di potassio (KNO_3) e diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4) sono state addizionate, all'inizio di ogni fase di somministrazione dell'esperimento, all'AMS di tre barattoli usati come trattamento (T) alle concentrazioni finali dei nutrienti di $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$, $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ e $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$. I restanti tre barattoli, contenenti l'AMS oligotrofica e l'alga, sono stati invece utilizzati tal quale come controllo (C).

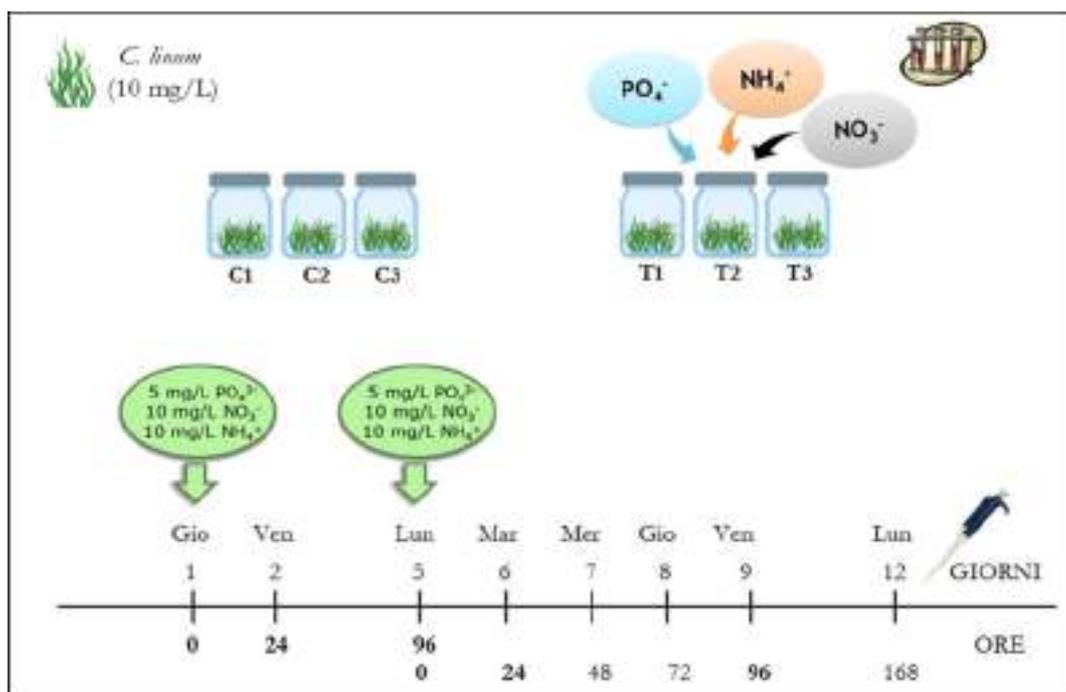


Figura 2.2.G – Disegno sperimentale implementato per lo studio della capacità di riduzione del carico inorganico di nutrienti dall'acqua di mare da parte dell'alga *C. linum*, in laboratorio.

Analisi dei nutrienti

Al fine di valutare la capacità di *uptake* dei nutrienti inorganici disciolti da parte della macroalga *Chaetomorpha linum*, a seguito di una doppia somministrazione dei nutrienti, è stata misurata la variazione nel tempo delle concentrazioni dello ione ammonio (NH_4^+), dei nitrati (NO_3^-) e dei fosfati (PO_4^{3-}) nell'acqua di mare.

Il contenuto di ammonio nell'acqua di mare è stato misurato con un pHmetro (HI 5222, Hanna Instruments, Woonsocket, USA) dotato di un elettrodo selettivo per gli ioni ammonio (HI 4101, Hanna Instruments, Woonsocket, USA), calibrato nell'intervallo 0-10 mg L⁻¹ secondo le istruzioni del produttore ed espresso come mg NH₃ L⁻¹ (Neori et al., 2000; Sanz-Lázaro & Marin, 2006).

Il contenuto di nitrati è stato determinato spettrofotometricamente con uno spettrofotometro Beckman DU 6400 secondo (Carvalho AP, Meireles LA, 1998) con piccole modifiche. I campioni di acqua di mare (1,25 mL) sono stati trattati con HCl di 0.025 mL e l'assorbanza specifica, misurata a 220 nm, è stata regolata sottraendo assorbanza non specifica a 275 nm a causa dell'interferenza di composti organici. La concentrazione di nitrati è stata determinata facendo riferimento a una curva standard con un intervallo di 0-10 mg L⁻¹ ed espressa in mg NO₃⁻ L⁻¹.

Il contenuto di fosfati è stato determinato secondo Strickland & Parsons (1972) dalla determinazione spettrofotometrica di un complesso fosfomolibdico blu che assorbe specificamente a 882 nm. La concentrazione di fosfati è stata determinata facendo riferimento a una curva standard con un intervallo di 0-5 mg PO₄³⁻ L⁻¹.

L'efficienza di rimozione dei nutrienti da parte dell'alga *C. linum* è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{Efficienza di rimozione dei nutrienti (\%)} = 100 - \left(\frac{100 * C_t}{C_0} \right)$$

dove C_0 e C_t corrispondono alla concentrazione dei nutrienti (NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^{3-}), espressa in mg L^{-1} , tra un tempo sperimentale e l'altro e tra le due fasi di somministrazione.

Analisi statistica

Tutti i dati sperimentali sono stati calcolati come variabili dipendenti usando Permanova come approccio simile all'ANOVA parametrica. I test univariati di Permanova sono stati eseguiti su matrici di somiglianza Bray-Curtis con 9999 permutazioni (Anderson, 2001). I fattori "trattamento", ovvero presenza (barattolo trattamento) e assenza (barattolo controllo) di nutrienti nell'AMS (TREAT, 2 livelli), "fasi di somministrazione" dei nutrienti (ADD, 2 livelli) e "tempo" riferito ai tempi di campionamento confrontabili tra le due fasi, ovvero 0, 24 e 96 ore dopo le aggiunte (TIME, 3 livelli), sono stati utilizzati per rilevare differenze per ogni nutriente (NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^{3-}) tra le due fasi di somministrazione e nelle interazioni tra TREAT, ADD e TIME. Ogni interazione è stata analizzata individualmente utilizzando il test Permanova univariata con lo stesso disegno sperimentale. Dove necessario, per eseguire le analisi sono stati utilizzati i dati trasformati in una matrice di somiglianza Bray-Curtis con permutazioni 9999 (Anderson, 2001). Se il numero di permutazioni non dovesse risultare sufficiente per l'analisi di Permanova, il *p value* è stato ottenuto utilizzando un test di simulazione di permutazione (test di Montecarlo). Il Pairwise test è stato applicato per scoprire differenze statisticamente significative in ogni coppia di livelli di fattore in base al valore di significatività dei test di Permanova/Montecarlo. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il software Primer v6+ Permanova (Anderson et al., 2008).

Risultati sull'efficienza dell'alga sulla rimozione dei nutrienti

Le concentrazioni dei nutrienti nei barattoli controllo © e trattamento (T), misurate durante l'esperimento, sono riportate in Figura 2.2.H.

Nei barattoli T, le concentrazioni dei nutrienti hanno mostrato una diminuzione progressiva nel tempo anche a seguito della seconda aggiunta, seppur visibilmente più lenta rispetto alla prima. Nei barattoli C, invece, le concentrazioni dei fosfati e dell'ammonio sono rimaste pressoché inalterate nel tempo, ad eccezione dei nitrati, dove è stato osservato un leggero aumento al termine dei 12 giorni di esperimento, passando da $1,30 \pm 0,01$ a $1,64 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$.

Per l'ammonio è stata misurata un'efficienza di rimozione del nutriente del 76,3% dopo 24 ore dalla prima aggiunta e del 31,5% dopo la seconda, differenza che si è ridotta quasi del tutto dopo 96 ore (96,5% e 93,9%, rispettivamente, dopo la prima e la seconda aggiunta).

Una tendenza simile a quella dell'ammonio è stata registrata anche per i fosfati, in cui l'efficienza di rimozione di questo nutriente è risultata essere del 77,9% dopo 24 ore dalla prima aggiunta e del 26,2% dopo la seconda allo stesso tempo di campionamento, per poi eguagliarsi, anche in questo caso, 96 ore dopo ciascuna aggiunta.

Per i nitrati, invece, l'assimilazione di questo nutriente da parte dell'alga *C. linum* è risultata essere più lenta già dopo la prima aggiunta, registrando un'efficienza di rimozione del 23% dopo 24 ore. A seguito della seconda aggiunta, la concentrazione dei nitrati nei barattoli trattamento, nello stesso intervallo di tempo, è dapprima aumentata del 19%, per poi tornare lentamente a diminuire nei sette giorni di osservazione successivi, raggiungendo una concentrazione finale di $5,3 \pm 1,1 \text{ mg L}^{-1}$ e un'efficienza di riduzione del 53,4%.

L'analisi statistica Permanova ha evidenziato differenze significative delle concentrazioni di tutti i nutrienti in funzione dei fattori "tempo", "trattamento" e tra le due "fasi di somministrazione" dei nutrienti e nella loro interazione (TIMExTREATxADD). I test a posteriori Pairwise test per l'interazione "TIMExTREATxADD" per il fattore "ADD", ha evidenziato, per tutti i barattoli T, differenze altamente significative ($p < 0.01$) nell'efficienza di rimozione dei nutrienti tra le due fasi di somministrazione nel breve termine, ovvero dopo 24 ore, ma nessuna differenza statisticamente significativa nel lungo termine, dopo 96 ore, ad eccezione dei nitrati in cui la concentrazione di questo nutriente è rimasta pressoché alta in tutti i giorni dell'esperimento.



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
Fondo europeo per lo sviluppo della pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

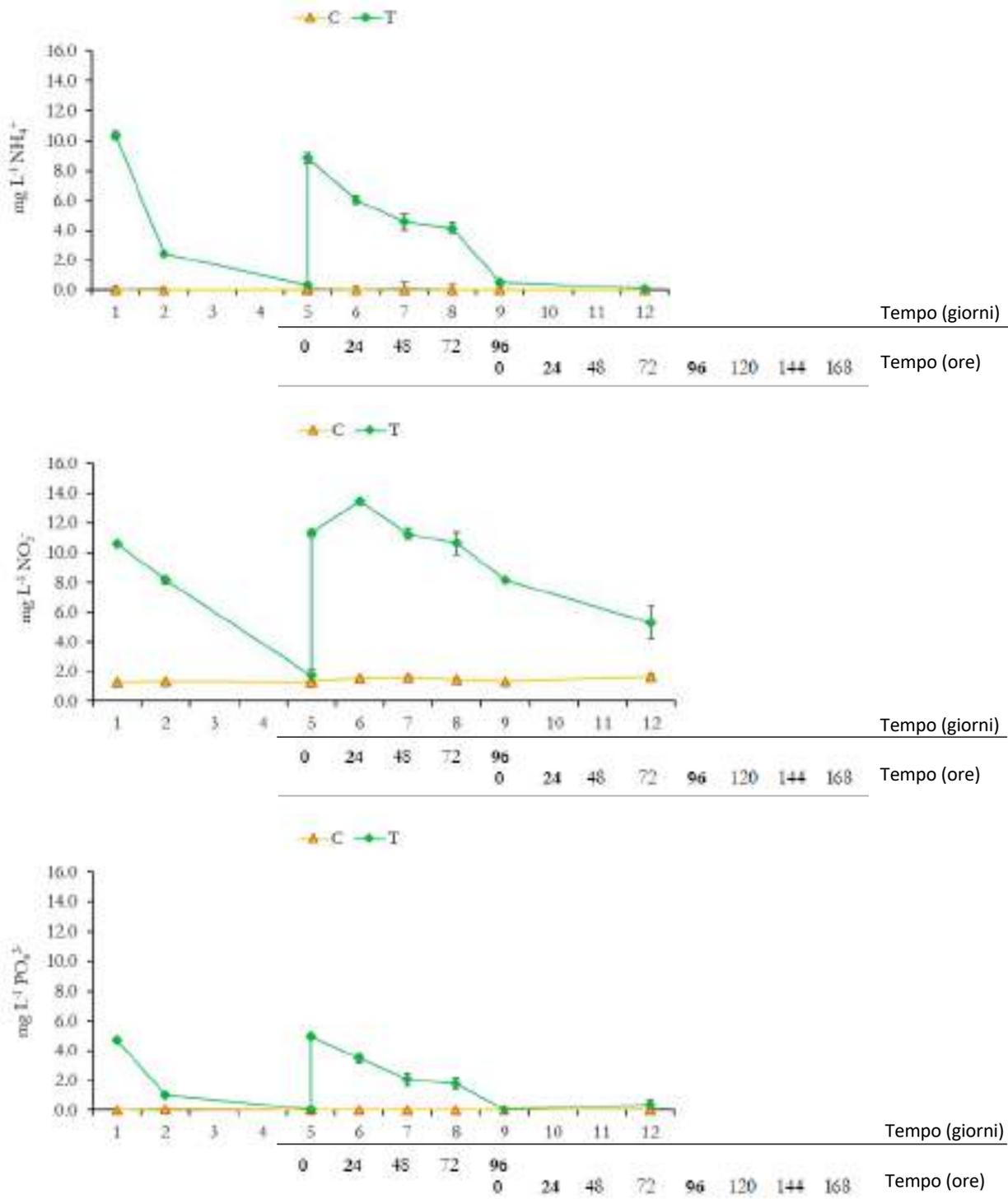


Figura 2.2.H – Variazione delle concentrazioni dei nutrienti ammonio NH₄⁺, nitrati NO₃⁻ fosfati PO₄³⁻ nel tempo riportato sull'asse delle ascisse sia come giorni (1 - 12 giorni) di esperimento che ore a seguito della prima (0 - 96 ore) e della seconda (0 - 168 ore) somministrazione di nutrienti.

Discussione dei risultati ottenuti

I risultati ottenuti nel presente lavoro hanno dimostrato come una densità pari a 10 mg L^{-1} dell'alga *C. linum* sia in grado di abbattere quasi completamente il carico inorganico di azoto e fosforo somministrato all'acqua di mare, anche in seguito ad una seconda somministrazione a distanza di quattro giorni.

Le analisi condotte sui campioni d'acqua prelevati durante gli esperimenti, hanno mostrato un'efficienza di rimozione dei nutrienti da parte di *C. linum* prossima al 100% sia per l'ammonio che per i fosfati, 96 ore dopo ciascuna aggiunta. Per i nitrati, invece, tale abbattimento è stato osservato solo in seguito alla prima somministrazione di nutrienti, mentre è apparsa molto più lenta in seguito alla seconda. Questa differenza nella efficienza di *uptake* di una forma azotata rispetto all'altra è in linea con quanto riportato in altri studi, in cui è stato dimostrato come il processo di assimilazione di questi composti è attivamente controllato dalla loro concentrazione intracellulare nei tessuti algali (McGlathery et al., 1996). I nitrati, infatti, una volta attraversata la parete cellulare, prima di entrare nella via biosintetica devono essere dapprima ridotti in ione ammonio, ad opera dell'enzima nitrato reduttasi, e solo allora potrà essere biotrasformato prima in composti organici semplici (principalmente amminoacidi e altri ammino- composti) e successivamente in proteine, clorofille e altre macromolecole (McGlathery et al., 1996). Per l'ammonio, invece, questo passaggio risulta essere più rapido, in quanto il *pool* di ammonio intracellulare, se presente in concentrazioni troppo elevate, può risultare tossico per l'alga stessa, pertanto entra direttamente nella via anabolica per essere rapidamente biotrasformato in molecole organiche, innocue, importanti per lo sviluppo algale (McGlathery et al., 1996).

Le *performance* di biorisanamento mostrate dall'alga durante gli esperimenti condotti, unite alle elevate capacità di resistenza alla manipolazione e di adattamento alle diverse condizioni ambientali, osservate durante gli esperimenti, e alla facile reperibilità di questa specie nelle comunità algali locali, rendono l'alga *C. linum* un eccellente candidato come organismo biorisanatore dei reflui dell'acquacoltura.

I dati raccolti durante questo lavoro sono stati di supporto per la successiva implementazione di un modello multi-trofico pesce-spugna-alga per il biorisanamento in acquacoltura, su scala sperimentale.

2.3 Progettazione e sperimentazione del prototipo di bioremediation in laboratorio

Tenendo conto dei risultati ottenuti dagli esperimenti di *bioremediation* condotti in laboratorio con la spugna *Sarcotragus spinosulus* e l'alga *Chaetomorpha linum*, è stato progettato e sperimentato un prototipo di biorisanamento multi-trofico, in scala di laboratorio, costituito da tre componenti “pesci-spugna-alga”, con l'obiettivo di ampliare le conoscenze per l'implementazione e lo sviluppo di un sistema efficiente di acquacoltura integrata su larga scala.

Raccolta degli organismi biorisanatori

Esemplari di spugna *S. spinosulus* e biomasse algali di *C. linum* sono stati raccolti rispettivamente nel Golfo di Taranto e nel Mar Piccolo di Taranto (Figura 2.3.A). Subito dopo la raccolta, spugne ed alghe sono state portate nei laboratori del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente dell'Università di Bari dove sono state delicatamente sciacquate con acqua di mare per rimuovere sedimento ed epibionti. Dopo questa procedura gli esemplari sono stati posti ad acclimatare per sette giorni in un acquario contenente 100 L di acqua marina sintetica filtrata (AMSF) (filtro con pori da 0,22 μm), in camera termostata ($21\pm 1^\circ\text{C}$), con aerazione delicata, pompe di movimento dell'acqua e illuminazione artificiale (fotoperiodo di 16:8 ore luce:buio).



Figura 2.3.A – Siti di raccolta di *S. spinosulus* in località San Vito (Taranto) e di *C. linum* presso il fiume Cervaro (secondo Seno del Mar Piccolo di Taranto) (Immagine modificata dal software Google Earth Pro, 2021).

Disegno sperimentale

L'esperimento è stato effettuato nel mese di ottobre 2022 e ripetuto a marzo 2023. Gli esperimenti sono stati condotti nelle medesime condizioni sperimentali del periodo di stabulazione e in tre repliche per ciascun periodo di raccolta (ottobre e marzo), per una durata di sei giorni.

Esemplari di spigola *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), con un peso medio per esemplare di 15 ± 1 g (media \pm DS), sono stati forniti da una avannotteria locale di Taranto.

Sono state allestite sei vasche (Figura 2.3.B), ognuna delle quali contenenti 15 L di AMSF e tre esemplari di spigola *D. labrax*. Delle sei vasche, tre sono state usate tal quali come vasche controllo (C) e tre usate come vasche trattamento (T) in cui sono stati aggiunti gli organismi biorisanatori: *S. spinosulus* ($41,6 \pm 4$ mL spugna L^{-1}) e *C. linum* (10 g peso fresco L^{-1}) (Figura 2.3.C).

Tutte le vasche sono state sottoposte ad alimentazione giornaliera, con mangime specifico fornito dall'avannotteria. Ogni 24 ore, campioni di acqua sono stati prelevati da ogni vasca per le analisi chimiche dei nutrienti (ammonio NH_4^+ , nitrati NO_3^- e fosfati PO_4^{3-} , mL^{-1}) e microbiologiche (batteri marini eterotrofi e Vibrionaceae). Inoltre, per tutta la durata di ogni esperimento, sono stati monitorati i parametri fisico-chimici delle acque presenti nelle vasche (torbidità, salinità, temperatura e pH).

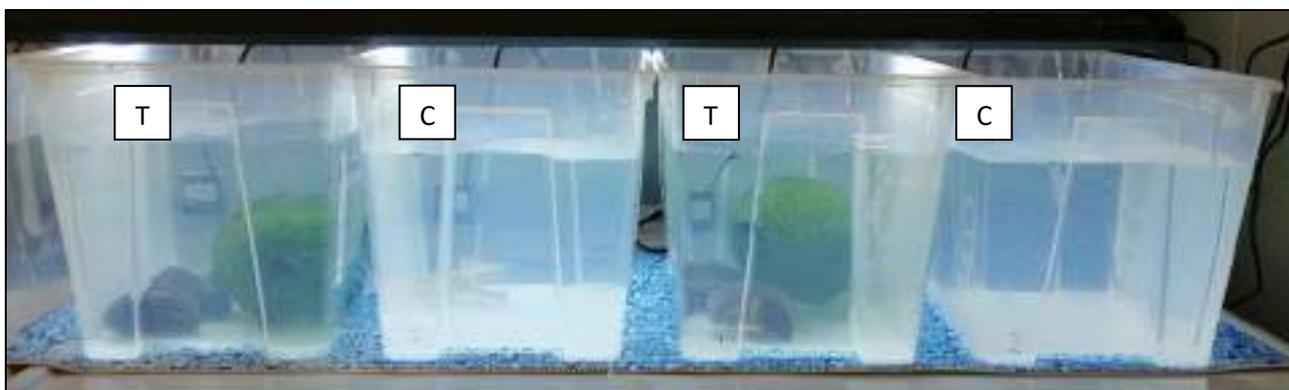


Figura 2.3.B – Alcune delle vasche allestite durante l'esperimento di biorisanamento: vasche controllo (C) contenenti esemplari di spigola *D. labrax* e vasche trattamento (T) contenenti le spigole e gli organismi biorisanatori, la spugna *S. spinosulus* e l'alga *C. linum*.

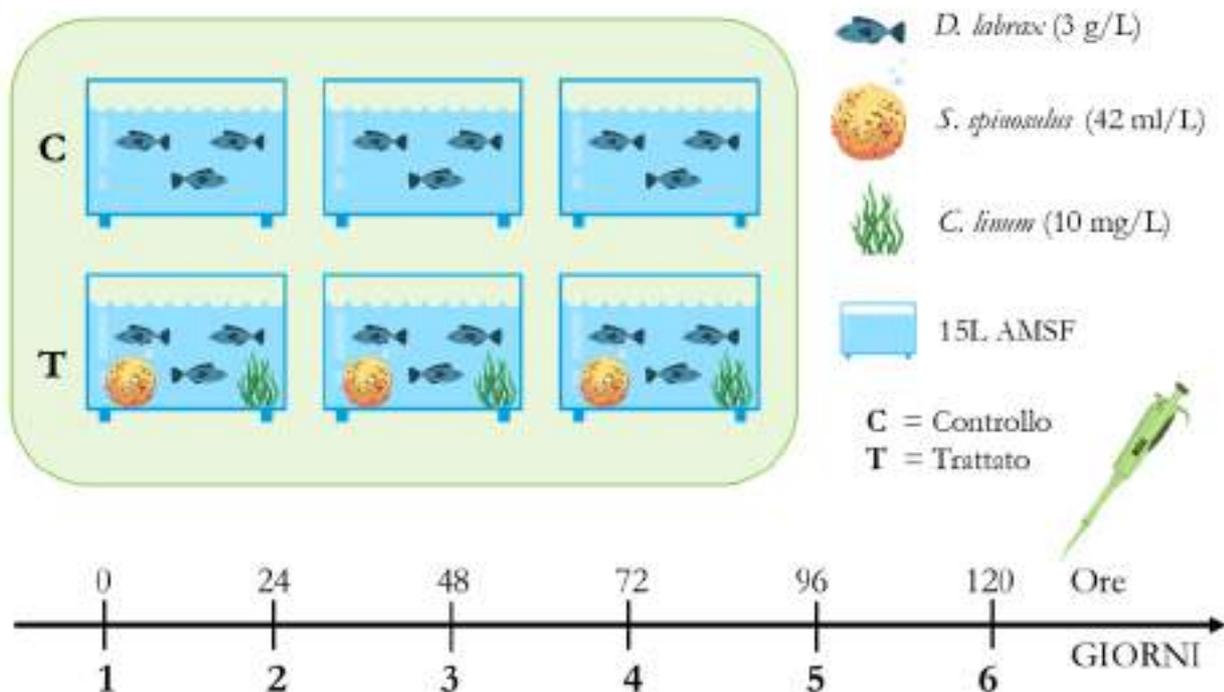


Figura 2.3.C – Disegno sperimentale di sperimentazione del prototipo di biorisanamento in laboratorio.

Analisi dei nutrienti e monitoraggio dei parametri fisico-chimici delle acque

Il contenuto di ammonio nell'acqua di mare è stato misurato con un pH-metro (HI 5222, Hanna Instruments, Woonsocket, USA) dotato di un elettrodo selettivo per gli ioni ammonio (HI 4101, Hanna Instruments, Woonsocket, USA), calibrato nell'intervallo 0-10 mg L⁻¹ secondo le istruzioni del produttore ed espresso come mg NH₃ L⁻¹ (Neori et al., 2000; Sanz-Lázaro & Marin, 2006).

Il contenuto di nitrati è stato determinato spettrofotometricamente con uno spettrofotometro Beckman DU 6400 secondo (Carvalho AP, Meireles LA, 1998) con piccole modifiche. I campioni di acqua di mare (1,25 mL) sono stati trattati con HCl di 0,025 mL e l'assorbanza specifica, misurata a 220 nm, è stata regolata sottraendo assorbanza non specifica a 275 nm a causa dell'interferenza di composti organici. La concentrazione di nitrati è stata determinata facendo riferimento a una curva standard con un intervallo di 0-10 mg L⁻¹ ed espressa in mg NO₃⁻ L⁻¹.

Il contenuto di fosfati è stato determinato secondo Strickland e Parsons (Strickland J.D.H., Parsons T.R, 1972) dalla determinazione spettrofotometrica di un complesso fosfomolibdico blu che assorbe specificamente a 882 nm. La concentrazione di fosfati è stata determinata facendo riferimento a una curva standard con un intervallo di 0-5 mg PO₄³⁻ L⁻¹.

Sono stati, inoltre, registrati i parametri fisico-chimici (torbidità - FNU, temperatura - °C e pH) mediante misuratore multi-parametrico Hanna Instruments, HI9829.

Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state condotte sull'acqua prelevata giornalmente da ognuna delle vasche sperimentali. La ricerca dei parametri microbiologici è stata effettuata mediante conta delle unità formanti colonie (CFU mL⁻¹) su terreni di crescita selettivi. A tal fine, per la ricerca dei batteri marini eterotrofi aliquote di 0,1 mL, e relative diluizioni, di acqua prelevata ad ogni tempo sperimentale sono state seminate su Marine agar (OXOID), mentre per la ricerca delle Vibrionaceae mediante semina su Thiosulphate-Citrate-Bile salt-Sucrose agar (TCBS, OXOID).

Le piastre sono state incubate a temperatura ambiente (22±2 °C) per 24 ore, la densità batterica (CFU mL⁻¹) è stata successivamente calcolata contando tutte le colonie cresciute sulle piastre e moltiplicando il valore ottenuto per fattore di diluizione della semina.

Analisi statistica

Tutti i dati sperimentali sono stati calcolati come variabili dipendenti usando Permanova come approccio simile all'Anova parametrica. I test univariati di Permanova sono stati eseguiti su matrici di somiglianza Bray-Curtis con 9999 permutazioni (Anderson, 2001). I fattori "trattamento", ovvero presenza (vasca trattamento) e assenza (vasca controllo) di organismi biorisanatori (TR, 2 livelli), "replica" dell'esperimento riferita ai mesi di ottobre e marzo (M, 2 livelli) e "tempo" espresso in giorni (G, 6 livelli), sono stati utilizzati per rilevare differenze nelle concentrazioni dei nutrienti (NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₄³⁻) e nei fattori concentrazioni batteriche (CFU) nelle interazioni tra TR, M e G. Ogni interazione è stata analizzata individualmente utilizzando il test Permanova univariata con lo stesso disegno sperimentale. Dove necessario, per eseguire le analisi sono stati utilizzati i dati trasformati in una matrice di somiglianza Bray-Curtis con permutazioni 9999 (Anderson, 2001). Se il numero di permutazioni non dovesse risultare sufficiente per l'analisi di Permanova, il *p value* è stato ottenuto utilizzando un test di simulazione di permutazione (test di Montecarlo). Il Pairwise test è stato applicato per scoprire differenze statisticamente significative in ogni coppia di livelli di fattore in base al valore di significatività dei test di Permanova/Montecarlo. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il software Primer v6+ Permanova (Anderson et al., 2008).

Riduzione del surplus di nutrienti

Le concentrazioni dei nutrienti (ammonio NH₄⁺, nitrati NO₃⁻ e fosfati PO₄³⁻) misurate durante gli esperimenti di ottobre e marzo nelle vasche controllo (C) e trattamento (T) sono riportate in Figura 2.3.D. Dai grafici si osserva come le concentrazioni dei nutrienti (mg L⁻¹ ± errore standard, ES) risultino sempre inferiori nelle vasche contenenti i biorisanatori (T) rispetto alle vasche C. I Risultati dell'analisi statistica univariata Permanova hanno evidenziato differenze significative tra i trattamenti (presenza e assenza dei biorisanatori nelle vasche) per tutti i nutrienti analizzati e in tutti i tempi di campionamento.

Tra i nutrienti, l'ammonio è risultato essere il prodotto che ha raggiunto la concentrazione più alta al termine degli esperimenti, con valori di $7,5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $11,28 \pm 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ misurati nelle vasche controllo rispettivamente nei mesi di marzo e ottobre (Figura 2.3.D). Nelle vasche contenenti i biorisanatori, invece, le concentrazioni dello ione ammonio, sempre al termine degli esperimenti, sono risultate essere più basse del 37,8% (ottobre) e del 71,6% (marzo) rispetto ai controlli. L'analisi della varianza Permanova ha messo in evidenza differenze significative nell'interazione dei fattori TR, M e G e nelle loro interazioni $TR \times M$, $M \times G$ e $TR \times G$ ($p < 0,01$). Il test a posteriori Pairwise test sui livelli di significatività ha messo in evidenza differenze altamente significative tra le vasche C e T in tutti i tempi (giorni), in entrambe le repliche. Inoltre, il test ha messo in evidenza un incremento significativamente continuo delle concentrazioni dello ione ammonio, sia nei controlli che nei trattati, in entrambi i mesi.

Differenze meno evidenti tra le vasche C e T sono state invece osservate per i nitrati, le cui concentrazioni sono aumentate nel tempo in tutte le vasche, restando comunque sempre più basse in presenza dei biorisanatori. Le concentrazioni di questo nutriente sono infatti passate da un valore iniziale (media \pm DS) di $0,55 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,84 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ nelle vasche C e $0,63 \pm 0,22 \text{ mg L}^{-1}$ nelle vasche T durante l'esperimento di ottobre e da $1,58 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ai valori finali di $2,91 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$ nelle vasche C e $2,33 \pm 0,36 \text{ mg L}^{-1}$ nelle vasche T durante l'esperimento di marzo.

Per i fosfati, in entrambe le repliche dell'esperimento, sono state osservate differenze fortemente significative tra le vasche C e T ($p < 0,01$) e in funzione del tempo ($p < 0,05$).

Le concentrazioni di PO_4^{3-} osservate nelle vasche T hanno subito un lieve aumento, mostrando valori al di sotto dello $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ per l'esperimento di ottobre e al di sotto di $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ per quello di marzo. Diversamente, nelle vasche C è stato osservato un aumento fortemente significativo nel tempo della concentrazione di questo nutriente ($p < 0,01$), fino al raggiungimento dei valori $2,39 \text{ mg L}^{-1}$ (ottobre) e $1,64 \text{ mg L}^{-1}$ (marzo) registrati al termine degli esperimenti.

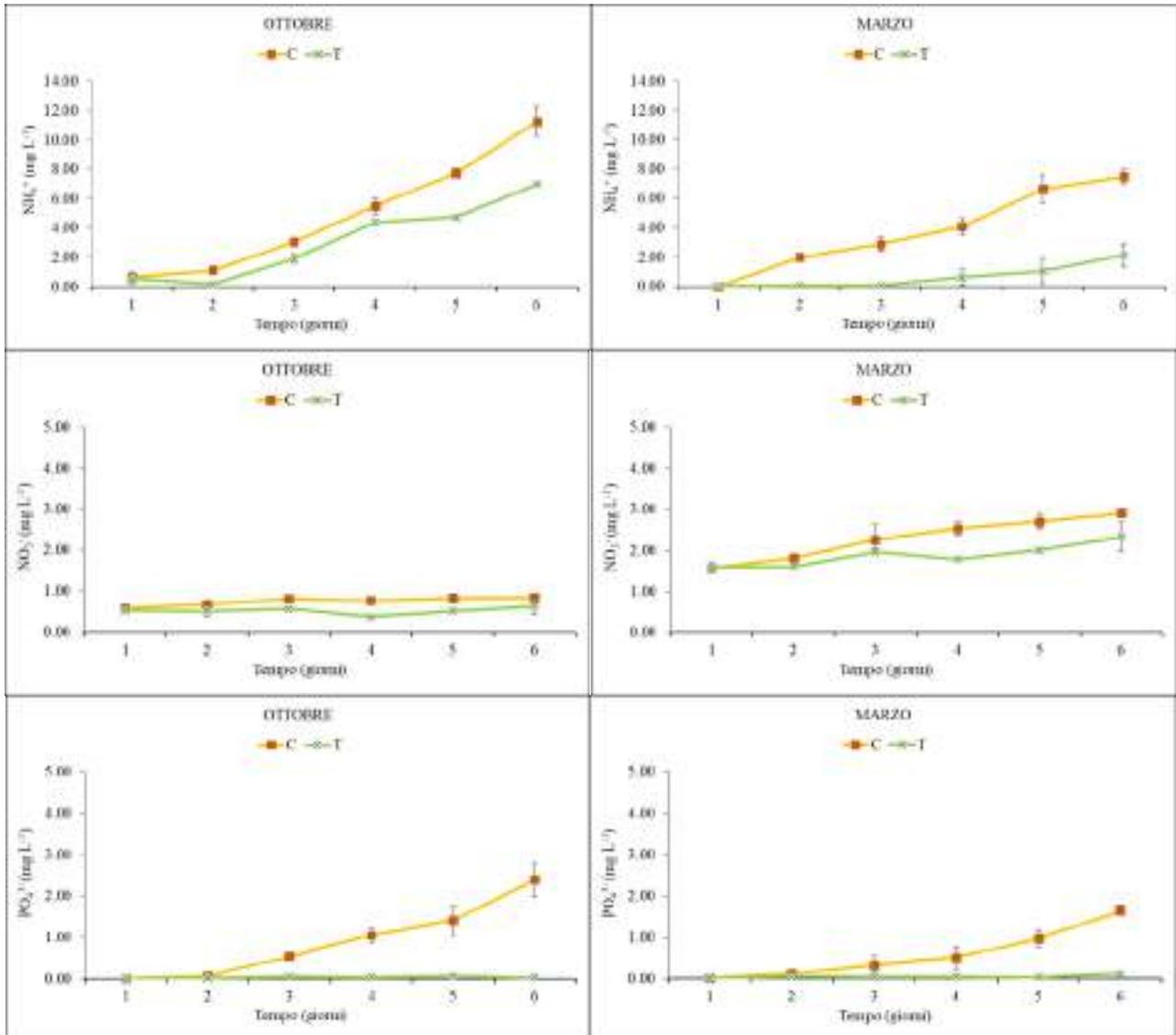


Figura 2.3.D – Variazione della concentrazione dei nutrienti: ammonio NH_4^+ , nitrati NO_3^- e fosfati PO_4^{3-} (mg L^{-1}) osservati nei campioni d'acqua prelevati durante gli esperimenti di biorisanamento condotti nei mesi di ottobre 2022 e marzo 2023. Le barre di errore indicano l'errore standard delle medie dei valori.

Monitoraggio dei parametri fisico-chimici delle acque

I dati raccolti sul monitoraggio dei parametri fisico-chimici delle acque, condotto durante gli esperimenti di ottobre e marzo, sono riportati in tabella 5.1. Dall'osservazione dei dati, non sono emerse variazioni significative dei parametri temperatura e pH, diversamente da quanto registrato invece per la torbidità. Questo parametro infatti ha mostrato importanti variazioni nel tempo nelle vasche C (solo pesci), raggiungendo, in alcuni tempi di campionamento, valori superiori a 10 FNU (Unità Nefelometriche di Formazina), mentre è rimasta pari a zero nelle vasche controllo, per tutta la durata dell'esperimento (Figura 2.3.E).

Tabella 2.3.1 – Monitoraggio giornaliero (media±ES) dei parametri fisico-chimici delle acque registrate durante gli esperimenti di biorisanamento.

C = vasche controllo (*D. labrax*); T = vasche trattamento (*D. labrax* + *S. spinosulus* + *C. linum*).

		Tempi di campionamento (giorni)					
Ottobre		1	2	3	4	5	6
pH	C	7,9±0,0	7,8±0,1	7,9±0,0	7,9±0,1	8,0±0,1	8,2±0,1
	T	8,1±0,0	7,9±0,0	8,2±0,1	8,0±0,1	8,0±0,2	8,0±0,2
Torbidità (FNU)	C	0,0±0	8,2±0,8	13,5±1,5	7,0±2,0	6,5±1,5	5,4±,6
	T	0,0±0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Temperatura (°C)	C	21±0	21±0	21±1	21±0	21±0	21±1
	T	21±0	21±0	21±1	21±0	21±0	21±1
Marzo		1	2	3	4	5	6
pH	C	8,2±0,0	7,6±0,0	7,9±0,0	7,9±0,1	8,0±0,1	7,9±0,0
	T	8,2±0,0	7,8±0,2	8,1±0,2	8,1±0,2	8,0±0,0	7,9±0,3
Torbidità (FNU)	C	0,0±0,0	9,1±1,2	15,8±2,3	5,7±1,6	5,5±1,5	5,0±1,5
	T	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
Temperatura (°C)	C	21±1	21±0	21±0	21±0	21±1	21±0
	T	21±1	21±0	21±0	21±0	21±1	21±0

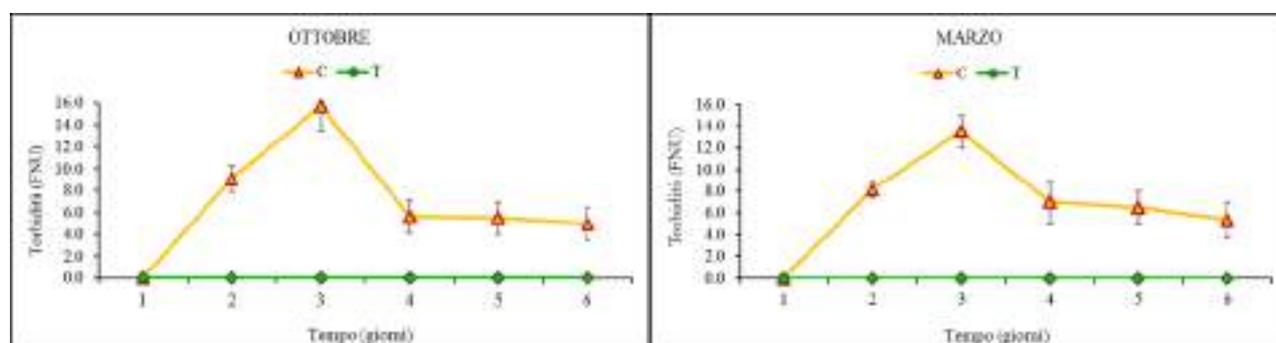


Figura 2.3.E – Variazione della torbidità (media±ES), registrata nelle vasche C e T durante gli esperimenti di ottobre e marzo.

Riduzione della carica microbica

Le analisi microbiologiche, della conta vitale dei batteri durante gli esperimenti, sono state condotte su due differenti terreni di crescita: Marine agar, per la conta dei batteri marini eterotrofi, e TCBS agar, terreno selettivo per la crescita delle Vibrionaceae (Figura 2.3.F). I grafici in Figura 2.3.G riportano il *trend* delle concentrazioni batteriche (CFU mL⁻¹ ± ES) misurate su entrambi i terreni, durante gli esperimenti di ottobre e marzo.

Per i batteri marini eterotrofi, differenze altamente significative tra le concentrazioni batteriche presenti nelle vasche C e quelle nelle vasche T sono emerse già a partire dal secondo giorno di campionamento ($p = 0,0001$), e sono perdurate fino alla fine degli esperimenti. Le concentrazioni batteriche nelle vasche controllo C sono aumentate sino a raggiungere i valori (media±DS) di $4,5 \pm 0,5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ (giorno 3) nell'esperimento di ottobre e di $1,4 \pm 0,8 \times 10^7$ CFU mL⁻¹ (giorno 4) in quello di marzo. Nelle vasche trattamento T, invece, il valore della carica microbica più alto è stato registrato, in entrambi gli esperimenti, il secondo giorno di campionamento ($1,9 \pm 0,2 \times 10^5$ CFU mL⁻¹ – ottobre; $6,3 \pm 4 \times 10^5$ CFU mL⁻¹ – marzo) seguito da un decremento nel tempo fino alla fine degli esperimenti, raggiungendo un valore nell'ordine di 10^3 CFU mL⁻¹.

Per i batteri appartenenti alla famiglia delle Vibrionaceae, è stato osservato un andamento molto simile a quello dei batteri marini eterotrofi, ma con valori di concentrazione batterica inferiori di uno o due ordini di grandezza. Differenze significative nelle concentrazioni delle Vibrionaceae tra le vasche C e le vasche T sono state registrate nei giorni 2, 3 e 4 di esperimento, in entrambe le repliche, ($p < 0,01$), in cui i valori nelle vasche T sono risultate essere inferiori di uno e due ordini di grandezza rispetto a quelli registrati nelle vasche C.

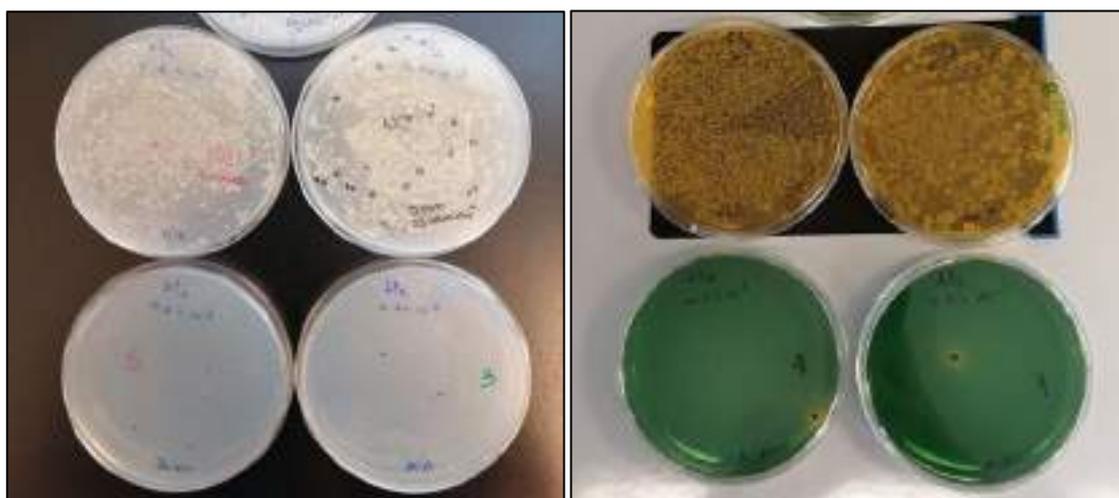


Figura 2.3.F – Alcune semine su piastre di Marine agar (sinistra) e TCBS agar (destra), in cui si possono facilmente osservare le differenze nella carica batterica tra le vasche controllo C (piastre in alto) e le vasche trattamento T (piastre in basso), dopo tre giorni dall'inizio dell'esperimento.

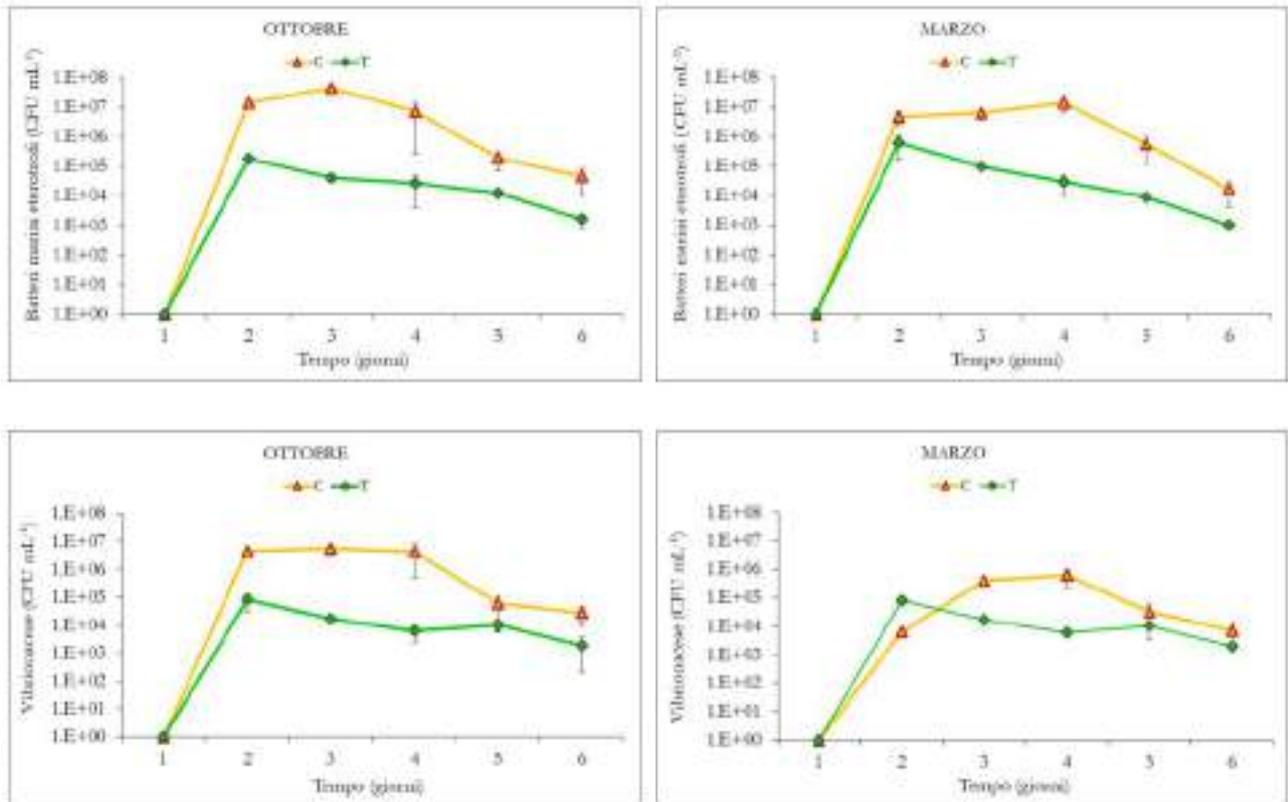


Figura 3.2.G – Variazione delle densità batteriche dei batteri marini eterotrofi e delle Vibrionaceae (CFU mL⁻¹) osservate nelle vasche controllo (C) e trattamento (T) durante gli esperimenti di biorisanamento condotti nei mesi di marzo e ottobre 2021. Le barre di errore indicano l'errore standard delle medie dei valori.

Discussione dei risultati ottenuti

I risultati ottenuti da questa sperimentazione dimostrano come l'associazione della spugna *S. spinosulus* e dell'alga *C. linum*, alle spigole *D. labrax*, nel prototipo di biorisanamento in scala di laboratorio, abbia determinato una riduzione importante della carica batterica e del contenuto di nutrienti, ottenendo come risultato un miglioramento della qualità dell'acqua circostante.

Tra i nutrienti, l'ammonio è risultato essere in composto inorganico più abbondante rilasciato dai pesci nell'acqua al termine degli esperimenti ($11,3 \pm 1 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, vasche C, esperimento di ottobre). Questa forma azotata, derivante principalmente dalla decomposizione delle proteine, è l'elemento che più condiziona la vita acquatica per la sua tossicità. Infatti, già a livelli molto bassi, l'ammoniaca può provocare nei pesci emorragie, ipertrofia delle lamelle branchiali, lesioni al fegato e al cervello, oltre che a rallentarne la crescita (Perolo, 2015). In presenza degli organismi biorisanatori, però, questo elemento viene rapidamente sottratto dall'acqua, mostrando una capacità di riduzione di questo ione fino al 70% rispetto ai valori registrati nelle vasche C.

Anche per i fosfati e i nitrati sono state osservate importanti riduzioni nella concentrazione, caratteristica altrettanto importante in quanto è noto che questi composti, se presenti in elevate concentrazioni, possono

generare fenomeni di eutrofizzazione e condizioni di ipossia nelle acque, con impatti di più o meno importanti sull'ambiente e sulla sua biodiversità. (Claudet & Frascchetti, 2010; Jegatheesan et al., 2011; Paul & Vogl, 2011; Pillay, 2008).

Anche le analisi microbiologiche, condotte sui campioni d'acqua, hanno rivelato importanti riduzioni nella concentrazione batterica nelle vasche T rispetto alle vasche C. Sono state misurate riduzioni fino a tre ordini di grandezza in presenza degli organismi biorisanatori *S. spinosulus* e *C. linum*. Inoltre, confrontando i risultati ottenuti delle conte batteriche effettuate su Marine agar e TCBS agar, è emerso che, nella maggior parte dei casi, più del 70% dei batteri marini eterotrofi presenti nell'acqua di mare appartengono alla famiglia delle Vibrionaceae. Questo dato è molto interessante in quanto questa famiglia comprende in parte batteri patogeni, come il *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. ordalii*, *V. alginolyticus* e *V. anguillarum*, i quali rappresentano una delle principali minacce per gli allevamenti ittici in quanto spesso responsabili di infezioni batteriche e morie nei pesci allevati (Austin & Austin, 2016; Ina-Salwany et al., 2019; Kashulin et al., 2017). Un altro aspetto interessante, osservato durante questi esperimenti, ha riguardato la torbidità. Valori elevati di questo parametro sono stati misurati esclusivamente nelle vasche C già a partire dal secondo giorno di esperimento, in cui la torbidità rendeva difficoltosa l'individuazione dei pesci. Nelle vasche contenenti i biorisanatori, invece, tali valori sono risultati essere pari a zero per tutta la durata dei due esperimenti, dimostrando come la demospongia *S. spinosulus* agisca efficacemente non solo sulla componente batterica ma anche sulla materia organica disciolta, migliorando ulteriormente la qualità dell'acqua circostante.

2.4 Verifica del gradimento delle specie “biofiltro”

La diffusione dei poriferi (spugne) nell'acquariofilia rappresenta ancora una sfida per questo settore, poiché il grado di apprezzamento di tali specie può variare in base all'esperienza e alle preferenze degli appassionati. Generalmente solo acquariofili esperti si cimentano con questi invertebrati e diversi fattori possono influenzare il gradimento delle spugne negli acquari domestici. L'aspetto estetico gioca un ruolo fondamentale, poiché le spugne, con la loro varietà di forme, colori e strutture peculiari contribuiscono all'estetica dell'acquario. Tuttavia, la complessità di cura delle spugne richiede una gestione più attenta rispetto ad altri organismi da acquario. Gli appassionati disposti a dedicare risorse alla cura di questi invertebrati potrebbero apprezzare maggiormente l'opportunità di includere spugne nei loro mesocosmi, in particolare se fosse matura la consapevolezza del ruolo di questi invertebrati di veri e propri “biofiltri”.

Esemplari di spugne ottenute in sistemi IMTA potrebbero costituire una risorsa preziosa per il settore dell'acquariofilia. Questo approccio consentirebbe la produzione sostenibile di specie ornamentali, le quali svolgerebbero contemporaneamente la funzione di biofiltro.

Con l'intento di diffondere le conoscenze sull'uso di questi invertebrati nel settore acquariofilo è stata avviata una collaborazione con un punto vendita locale dove sono state allestite vasche con alcune specie di poriferi

(Figura 2.4.A). Il personale del punto vendita ha provveduto al loro mantenimento in acquario, a presentarle ai clienti come possibili nuove specie ornamentali e a spiegare i vantaggi di avere organismi biofiltro in acquario. Inoltre, per sondare l'attenzione degli appassionati e verificare il gradimento verso queste specie è stato condotto un sondaggio attraverso la diffusione di un questionario anonimo in tutti i negozi di specializzati locali e attraverso i social media su tutto il territorio nazionale. Inoltre, è stato realizzato un codice a risposta rapida (QR) che è stato distribuito anche all'interno degli ambienti universitari italiani.



Figura 2.4.A – Una delle vasche espositive allestite presso un punto vendita di Bari con due specie di spugne: *Aplysina aerophoba* (gialla) e *Axinella cannabina* (arancione).

2.4.1. Conduzione di un sondaggio per valutare il gradimento delle specie “biofiltro” nel settore acquariofilo

I dati del rapporto Assalco-Zoomark (2022) indicano che gli animali d'affezione maggiormente presenti in Italia sono i pesci che, con 29,9 milioni di esemplari, rappresentano poco meno della metà del totale dei “pet” che vivono nelle famiglie italiane.

La raccolta di specie ornamentali per acquariologia si basa principalmente su stock naturali che rimuovono ogni anno milioni di organismi marini dagli ecosistemi locali, ed i paesi tropicali dell'Asia e degli Stati Uniti sono, rispettivamente, i maggiori esportatori e importatori (Wabnitz et al., 2003; Smith et al., 2008).

L'allevamento in sistemi di acquacoltura multi-trofica integrata (IMTA) di specie ornamentali destinati al settore dell'acquariologia rappresenta un nuovo ed innovativo percorso di valorizzazione della biomassa prodotta in modo sostenibile in tali sistemi.

In questo contesto, abbiamo condotto un'indagine su tutto il territorio nazionale per valutare l'interesse degli acquariofili italiani verso le spugne, invertebrati marini poco rappresentati nei pet-shop, e la loro disponibilità ad acquistarle da allevamenti sostenibili.

Realizzazione e diffusione del questionario

Le informazioni utili per lo studio sono state ottenute somministrando un questionario anonimo organizzato in quattro sezioni. All'inizio del questionario erano riportate le informazioni sui progetti di ricerca e sulla procedura di trattamento dei dati. Le prime tre domande (Sezione I), uguali per tutti, avevano come obiettivo quello di valutare le conoscenze generali dei partecipanti sulle spugne marine, sulla loro capacità di filtrazione e sui sistemi IMTA.

La seconda sezione (Sezione II), dedicata alle abitudini dei partecipanti in possesso di uno o più acquari, ha seguito un percorso di "ramificazione condizionata" (rappresentato in Figura 2.4.A) con la quale si chiedeva informazioni su: tipo di acquario, presenza di spugne in vasca o il motivo della loro assenza e modalità e frequenza di acquisto.



Figura 2.4.A – Il percorso di "ramificazione condizionata" seguito nella Sezione II del questionario. FW: Acqua dolce; IDK: "Non lo so".

La terza sezione (Sezione III) consisteva invece in cinque domande riguardanti la sostenibilità, l'attenzione all'ambiente, la consapevolezza dell'impatto ambientale derivante delle proprie azioni, la disponibilità a fare sacrifici per ridurli, l'interesse verso sistemi di produzione sostenibili e la vicinanza tra i luoghi di produzione e di vendita.

La quarta sezione (Sezione IV) ha raccolto informazioni socio-demografiche sui partecipanti, in particolare sesso, età, livello di istruzione e regione di residenza.

Le risposte alle domande della Sezione III hanno seguito una scala 5-Likert (da 1 = "per niente" a 5 = "completamente"). Dopo le Sezioni I e II, è stato aggiunto un breve paragrafo con le relative informazioni generali e immagini. Alla fine delle Sezioni II e III, è stata proposta un'ipotetica domanda sull'intenzione di acquisto per valutare un possibile mercato. Dopo la Sezione IV, è stata aggiunta una casella per inserire una risposta aperta con l'obiettivo di dare la possibilità ai partecipanti di comunicare qualsiasi informazione o suggerimento. Il questionario è stato realizzato utilizzando lo strumento gratuito "Moduli Google", l'indagine è stata diffusa nel mese di marzo 2023 su diversi gruppi acquariofilia italiana presenti sui social media come Facebook, Instagram, WhatsApp o Telegram. Inoltre, è stato realizzato e stampato un codice QR (Figura 2.4.B) che è stato distribuito in vari negozi di animali locali e all'interno degli ambienti universitari. La durata del sondaggio è stata di 6 mesi, con termine nel mese di settembre 2023.



Figura 2.4.B – Codice QR distribuito nei negozi di animali locali e all'interno degli ambienti universitari.

Analisi statistica

Le possibili relazioni tra lo status socio-demografico (regioni di residenza raggruppate in aree settentrionali, centrali e meridionali e livello di istruzione) e tutte le informazioni raccolte nelle Sezioni I, II e III, nonché la

domanda aperta finale, sono state esaminate mediante analisi univariata del chi-quadrato (χ^2) utilizzando R 4.3.0 (R Foundation, Vienna, Austria). I dati standardizzati sono stati utilizzati per rilevare proporzioni sovra o sottorappresentate in caso di relazioni significative.

Risultati sulle caratteristiche socio-demografiche e di cultura generale

Hanno partecipato allo studio complessivamente 101 persone provenienti da quasi tutte le regioni italiane (Figura 2.4.C), provenienti principalmente dalle aree settentrionali (Lombardia, Liguria, Veneto ed Emilia-Romagna) e meridionali (Puglia), con un'età media di 38 anni (DS: 14,22). Il rapporto di genere è risultato di 2:1 (66% maschi, 33% femmine), mentre il livello di istruzione ha mostrato all'incirca la stessa frequenza tra gli intervistati laureati e non laureati (rispettivamente 49% e 51%). È interessante notare che, sebbene quasi il 90% delle persone abbia indicato di avere conoscenze sulle spugne marine e della loro attività di filtrazione, solo il 21,8% sa cosa sono i sistemi IMTA e come funzionano, indipendentemente dal loro livello di istruzione ($\chi^2 = 1,149$, $p = 0,284$).

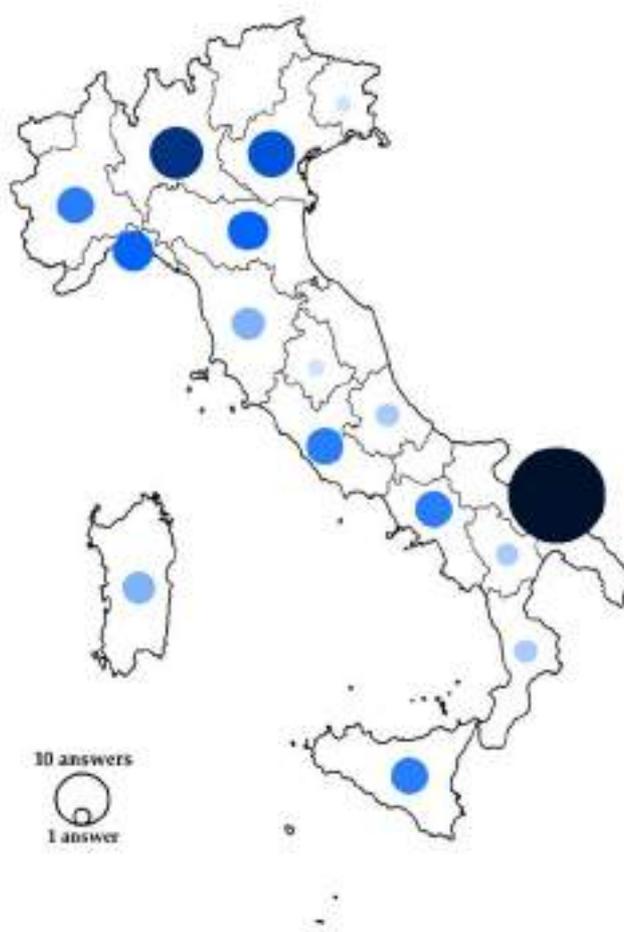


Figura 2.4.C – Risposte raccolte in base alla regione di provenienza degli intervistati. Ogni risposta è rappresentata da un cerchio, la cui dimensione e colore sono direttamente proporzionali alla sua frequenza.

Aquarium matters

Dai dati raccolti nella Sezione II (rappresentati in Figura 2.4.D), e nonostante gli sforzi nell'indirizzare il questionario a persone in possesso di acquari (preferibilmente marini), il 34,7% degli intervistati ha dichiarato di non averne nessuno e il 34,6% di avere acquari d'acqua dolce. Tra coloro che hanno acquari marini (30,7%), il 61,3% ha dichiarato di avere spugne nel proprio acquario, acquistandole almeno una volta all'anno (89,5%). Il possesso di acquari marini è proporzionalmente più alto in centro Italia, dove il 75% degli intervistati ne ha confermato la presenza in casa ($\chi^2 = 15.462$, $p = 0.004$) (Figura 2.4.E).

Per quanto riguarda la provenienza delle spugne presenti nei propri acquari, nelle risposte dominano gli scarti della pesca professionale (42,1%), seguiti dai negozi di acquari (36,8%), dagli acquariofili privati (10,5%) e dalla collezione personale e dallo shopping online (entrambi 5,3%) (Figura 2.4.D). Una informazione interessante è giunta da un intervistato che ha riferito che alcune delle sue spugne sono giunte nel suo acquario attraverso l'acquisto di rocce maturare in altri acquari le quali avevano adesi sulla loro superficie individui poco sviluppati e quindi impercettibili ad occhio nudo. In generale, le modalità di acquisizione delle spugne sul territorio nazionale variano da zona a zona ($\chi^2 = 20,571$, $p = 0,008$) (Figura 2.4.E), ad esempio tutti i residenti del Nord Italia intervistati hanno selezionato l'opzione "negozi di fiducia" (100%). Gli scarti della pesca commerciale hanno rappresentato invece il 66% delle risposte provenienti dall'area meridionale.

Gli intervistati che non hanno spugne nei loro acquari marini (29%) hanno dichiarato che le motivazioni sono legate principalmente all'impossibilità di poterle acquistare presso i negozi di fiducia (58,3%), nonché la mancanza di conoscenza e il disinteresse volontario (25 e 16,7%, rispettivamente, Figura 2.4.D), che varia a seconda della regione di appartenenza ($\chi^2 = 9,578$, $p = 0,048$) (Figura 2.4.E). Tuttavia, nell'ultima domanda di questa sezione, riguardante una possibile intenzione di acquisto proposta agli acquariofili che non hanno familiarità con le spugne marine (a causa della mancanza di un acquario marino o di conoscenze), l'82,2% delle persone ha mostrato un atteggiamento positivo nei confronti dell'idea proposta. L'area geografica non ha influenzato questi risultati ($\chi^2 = 1,473$, $p = 0,831$).

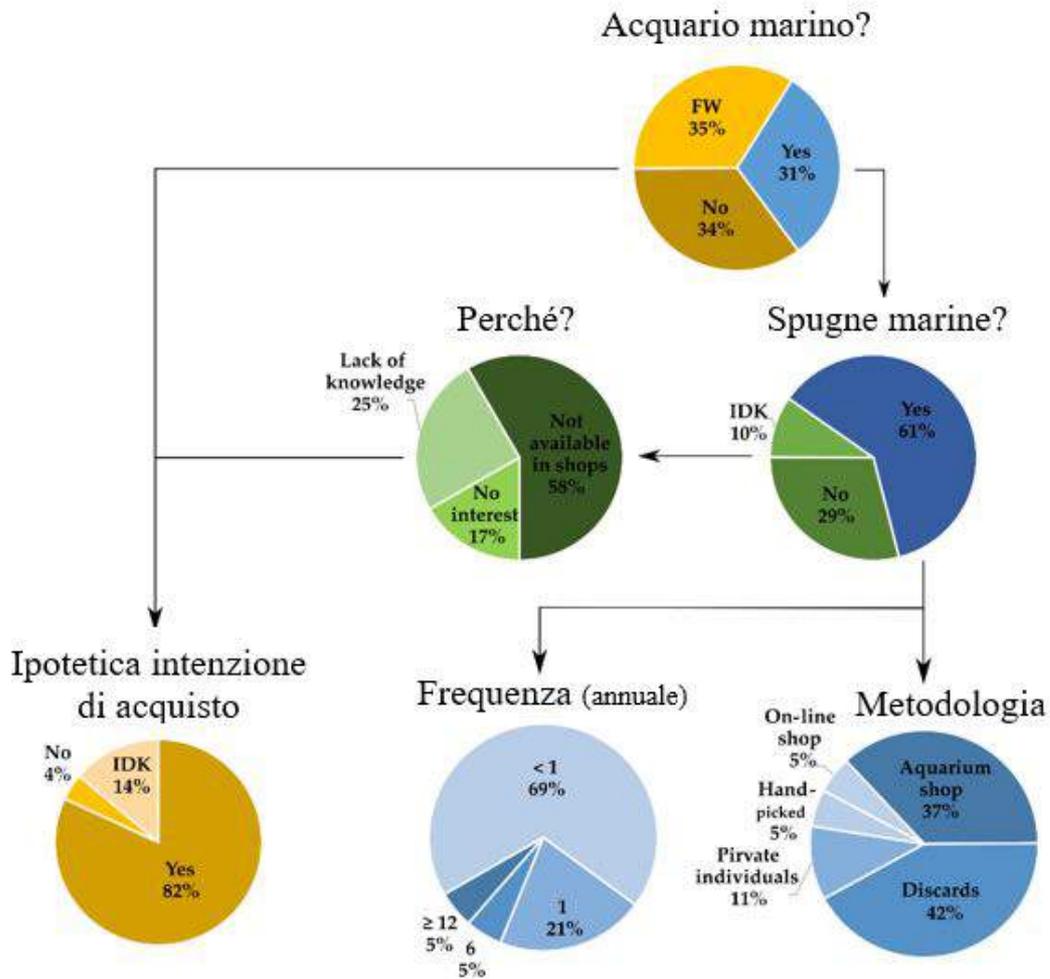


Figura 2.4.D – Rappresentazione con grafici a torta delle statistiche calcolate seguendo il percorso di "ramificazione condizionale" progettato per la Sezione II. FW: Acqua dolce; IDK: "Non lo so".

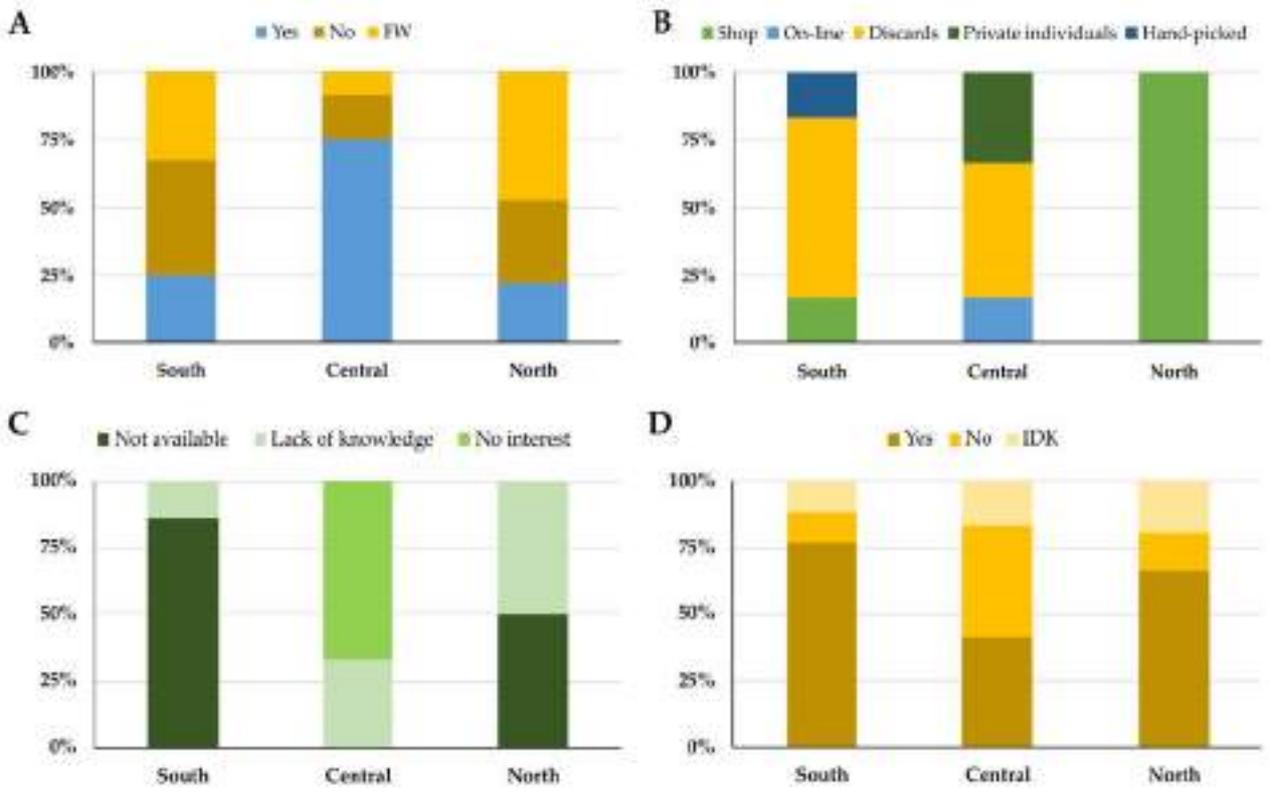


Figura 2.4.E – Frequenza delle risposte (%) in base all’area di residenza e al possesso dell’acquario marino (A), al metodo di acquisizione delle spugne (B), al motivo della loro assenza negli acquari marini (C) e all’intenzione di acquisto o al cambiamento di frequenza (D). FW: Acqua dolce; IDK: "Non lo so".

Consapevolezza sulla sostenibile

Nella sezione dedicata alla sostenibilità, la maggior parte degli intervistati si è dichiarata preoccupata e disposta a fare sacrifici per l’ambiente (rispettivamente il 95% e l’84%), anche se il 37% è titubante sull’impatto delle proprie azioni sull’ambiente (Figura 2.4.F). Questo atteggiamento dubbioso differisce leggermente tra le aree ($\chi^2 = 6,053, p = 0,048$), le regioni centrali mostrano una percentuale più elevata di questi intervistati (66% contro il 36,1% e l’8,8% registrati rispettivamente da nord e da sud).

Per quanto riguarda i sistemi di produzione, la quasi totalità (92%) concorda sull’alto valore dell’utilizzo di sistemi sostenibili e il 77% attribuisce grande importanza alla vicinanza geografica tra il luogo di produzione e quello di vendita dei prodotti (Figura 2.4.F). Tuttavia, questi ultimi risultati hanno una forte componente geografica ($\chi^2 = 27.989, p < 0.001$), poiché quasi il 70% degli intervistati del sud attribuisce alla vicinanza un’importanza moderata o minore rispetto al 16,7% di ciascuna delle altre regioni.

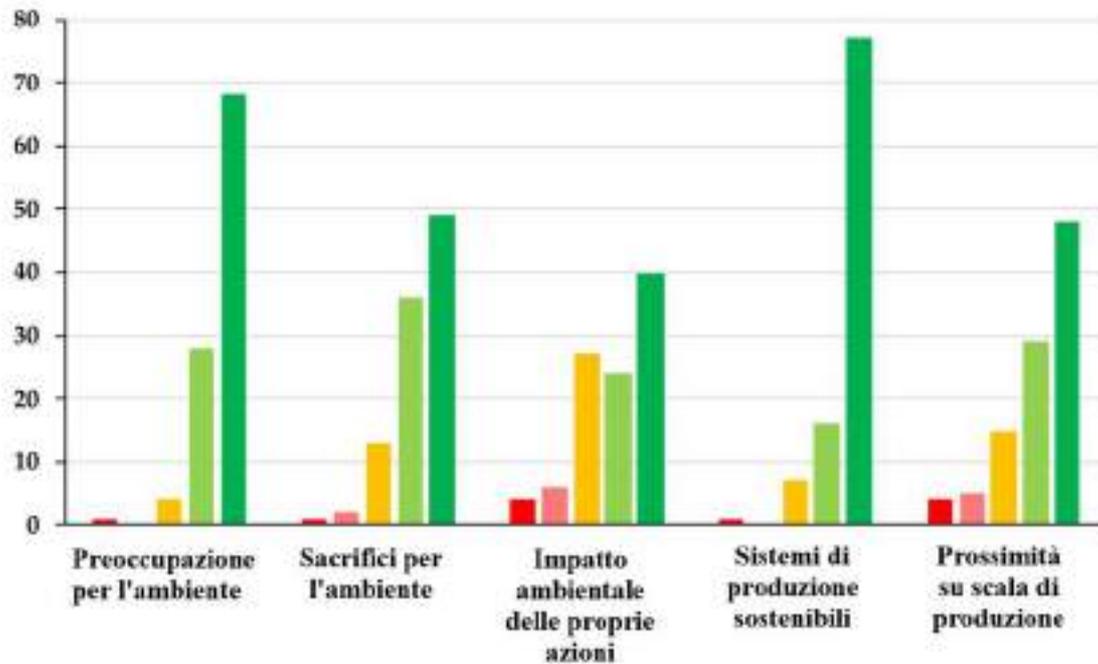


Figura 2.4.F – La percezione della sostenibilità degli intervistati registrata nella Sezione III per numero di risposte che esprimono il livello di conformità o importanza: da "per niente" (rosso) a "completamente" (verde).

Effetto della sostenibilità su un'ipotetica intenzione di acquisto

Alla domanda finale sull'ipotetica intenzione o cambio di frequenza di acquisto riguardo alle spugne allevate in sistemi di produzione sostenibili come IMTA (rappresentato in Figura 2.4.G), solo il 17% del numero totale degli intervistati non ha mostrato interesse, di cui il 76,6% non conferma la presenza di spugne marine (o perché mancano acquari marini o spugne al loro interno). D'altro canto, due intervistati su tre che sarebbero disposti ad acquistarle (68,3%), ed il 20,1% di quelli disposti ad acquistarli sono persone che attualmente dispongono di spugne (prevalentemente da negozi di acquariofilia) e l'8,4% non le ha per indisponibilità o mancanza di conoscenza, mentre il resto sono persone senza acquario o con acquario d'acqua dolce. Il 15% degli intervistati era titubante riguardo alla possibilità di mercato proposta, essendo prevalentemente persone senza acquario marino (73%). L'area geografica ha leggermente influenzato questi risultati ($\chi^2 = 8,4$, $p = 0,078$), gli intervistati dell'Italia centrale sono meno disposti ad acquistare spugne.

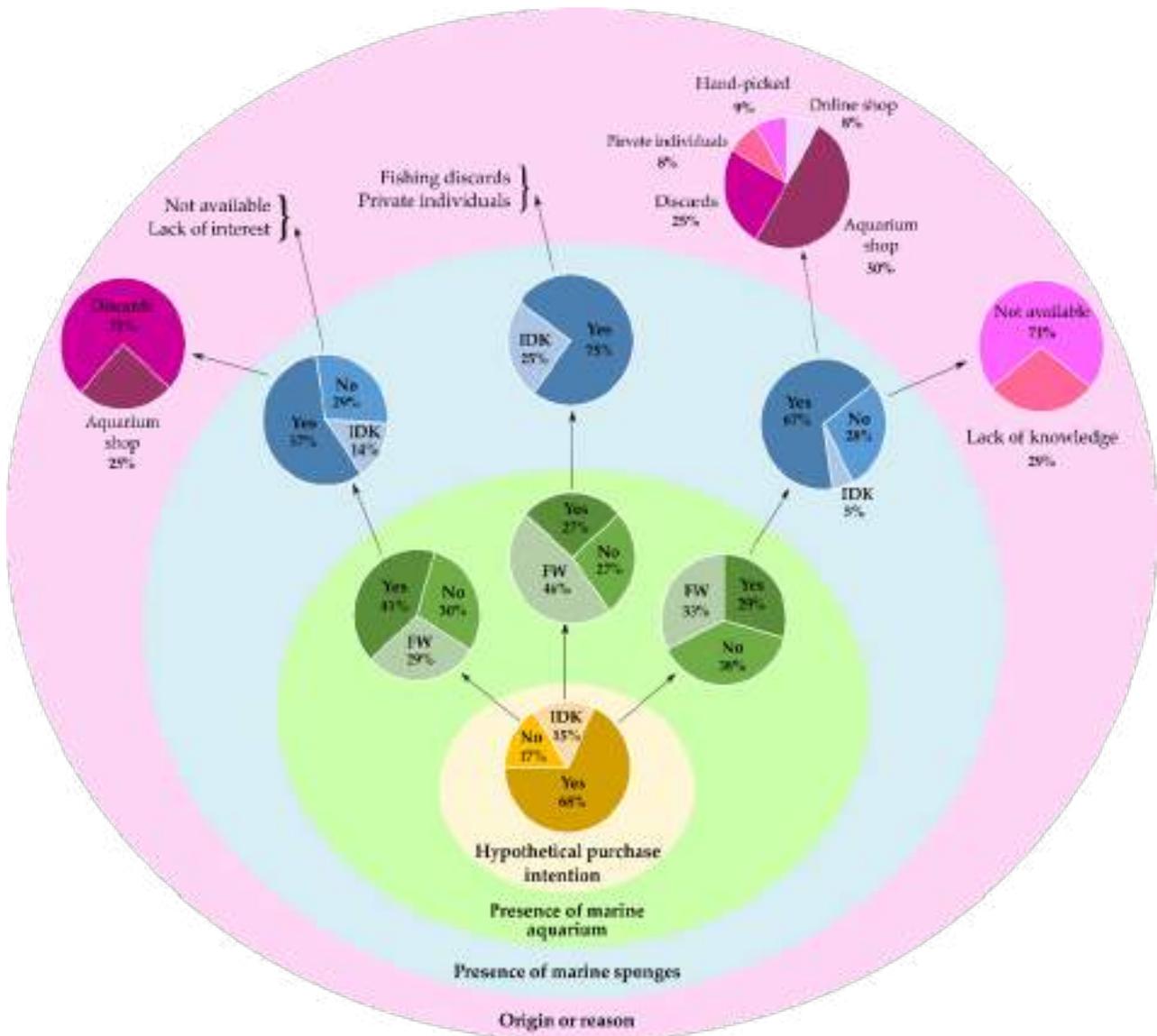


Figura 2.4.G – Classificazione di tutti gli intervistati in base alla risposta data all’ultima domanda. La mancanza di un grafico a torta nel cerchio rosa indica un’origine o un motivo quasi altrettanto frequente (50:50%). FW: Acqua dolce; IDK: "Non lo so"; Hypothetical purchase intention: “Ipotetica intenzione di acquisto”; Presence of marine aquarium: “Presenza di acquari marini”; Presence of marine sponge: “Presenza di spugne marine”; Origin or reason: “Origine o motivo”.

Discussione dei risultati

Il questionario progettato e le diverse piattaforme social di diffusione utilizzate hanno permesso di ottenere 101 risposte da quasi tutto il territorio italiano. Anche il formato fisico diffuso localmente (ovvero il codice QR) si è dimostrato efficace, essendo responsabile della quantità significativamente più elevata di risposte ricevute dalla Puglia. Anche nelle regioni interne le spugne e la loro capacità di filtrazione sono ben conosciute dagli italiani (88%). I sistemi IMTA, nonostante siano un tema di ricerca sempre più attuale con più di 160

articoli pubblicati negli ultimi 15 anni (ricerca condotta interrogando con la parola chiave “*Integrated Multi-trophic Aquaculture*” il database Scopus, in data 11 settembre 2023), risultano tuttavia noti solo a 1 su 5 intervistati, il che evidenzia la necessità di sviluppo e divulgazione di questo approccio sostenibile.

La valorizzazione della biomassa non edule proveniente da sistemi IMTA è un tema ampiamente noto in ambito sperimentale ma ancora poco conosciuto a livello imprenditoriale. Tale gap di conoscenza si riflette sulla scarsa diffusione e implementazione di sistemi di allevamento sostenibili e rispettosi dell’ambiente. Tuttavia, con l’intento di favorire la diffusione di pratiche IMTA che includono specie non eduli di difficile collocamento commerciale per le aziende disposte ad avviare tali sistemi di allevamento si stanno sviluppando linee di ricerca per la valorizzazione di questo *by-product*. A tal proposito, recentemente è stato dimostrato che la biomassa non edule prodotta in sistemi IMTA mediterranei, come il polichete *Sabella spallanzanii*, può essere utilizzata nella formulazione di mangimi per pesci d’acquario tropicali (Arduini et al., 2023) o come esche per la pesca sportiva. Inoltre, alcune spugne proposte come specie ornamentali per acquari (Calado, 2006) sono già state allevate con successo in sistemi IMTA (ad esempio *Ircinia* sp. e *Aplysina aerophoba*) (Aguilo-Arce et al., 2023; Longo et al., 2023, 2020). L’acquariologia, pertanto, può rappresentare un mercato promettente a cui destinare le biomasse non eduli ottenute in impianti IMTA. Considerando che mediamente un acquario contiene circa sette pesci e che un acquario su dieci è marino, si può stimare la presenza di circa 427.000 acquari marini in Italia (Assalco-Zoomark, 2022). Proiettando i risultati ottenuti dal presente questionario, circa 275.500 acquariofili italiani sarebbero disposti ad acquistare spugne allevate in modo sostenibile con una media di 1 acquisto/anno (Sezione II del questionario). Dalle informazioni raccolte dalle piattaforme di vendita on-line (circa 10 euro/esemplare di spugna, Acquariomania.net; ex-oticfarm.shop) si può stimare un valore di mercato per questo settore di quasi 3 milioni di euro/anno.

CAPITOLO 3

FASE 2: SPERIMENTAZIONE DEL PROTOTIPO DI SISTEMA DI ALLEVAMENTO MULTITROFICO AD INVERTEBRATI E ALGHE IN CAMPO

3.1	Allestimento sperimentale del prototipo di biorisanamento	171
3.2	Monitoraggio del benessere degli organismi biorisanatori	179
3.2.1	Valutazione dello stato di salute degli invertebrati	
3.2.2	Analisi degli indicatori di stress e contenuto di pigmenti fotosintetici nelle macroalghe	
3.3	Monitoraggio delle <i>performance</i> di biorisanamento	183
3.3.1	Analisi del contenuto di nutrienti (sali di azoto e fosforo) nelle acque	
3.3.2	Analisi del contenuto di nutrienti (sali di azoto e fosforo) nelle macroalghe	
3.3.3	Analisi della componente microbiologica nell'acqua	
3.3.4	Determinazione dei solidi sospesi nell'acqua	
3.4	Valutazione comparativa del benessere dei pesci allevati in un sistema multi-trofico ed in uno tradizionale	194

3.1 Allestimento sperimentale del prototipo di biorisanamento

Raccolta degli organismi biorisanatori e allestimento delle vasche sperimentali di biorisanamento

Gli organismi biorisanatori utilizzati per la sperimentazione del prototipo di allevamento multi-trofico ad invertebrati e alghe realizzato presso la sede della COISPA Tecnologia & Ricerca, sono stati selezionati sulla base delle esperienze pregresse del gruppo di ricerca e quelle di laboratorio realizzate nel corso della FASE 1 del presente progetto.

Tra gli invertebrati è stata scelta la demospongia *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1814), l'anellide polichete *Sabella spallanzanii* (Gmelin, 1791) e la macroalga verde *Chaetomorpha linum* (O.F. Muller) Kützinger.

Le biomasse dei biorisanatori sono state raccolte nei mari interni tarantini, nel Primo e nel Secondo Seno del Mar Piccolo (Figura 3.1.A). Il materiale raccolto è stato immediatamente trasportato in appositi contenitori a temperatura controllata presso la sede della COISPA, dove si è provveduto a rimuovere gli epibionti presenti sia sulla spugna che sull'alga.

Gli esemplari raccolti sono stati posti ad acclimatare per due-tre settimane, circa, in una vasca dedicata prima di posizionarli in co-coltura con i pesci.

Sono state effettuate due raccolte in natura di biorisanatori: la prima agli inizi di novembre 2022 e la seconda agli inizi di gennaio 2023.

In particolare, *Hymeniacidon perlevis* è stata prelevata in immersione asportando la porzione apicale di esemplari largamente diffusi nel Secondo Seno del Mar Piccolo (Figura 3.1.B). Tale tecnica consente di lasciare in situ la parte basale dell'esemplare che rapidamente ripristina la sua funzionalità, con un modesto impatto sull'ecosistema acquatico. Le sabelle sono state raccolte in immersione tra quelle presenti sui substrati artificiali del Primo Seno del Mar Piccolo (Figura 3.1.B). Sono stati selezionati individui aventi una lunghezza del tubo di 15 cm circa. Infine, la macroalga è stata raccolta nel tratto di mare antistante la foce del Cervaro nel Secondo Seno del Mar Piccolo.

Le spugne una volta ripulite dagli epibionti sono state tagliate mediante cutter con lama in acciaio, da cui sono stati ottenuti circa 12 espianti di spugna, ognuno di circa 360 ml di volume. Gli espianti sono stati quindi posizionati in supporti di plastica forati e ricoperte con una rete. I policheti sono stati fissati a nasse appositamente predisposte, mentre le alghe sono state posizionate in sacchetti di rete da 500 g ciascuno.

La sperimentazione ha previsto l'allestimento di diverse vasche: una con orate (*Sparus aurata*) e biorisanatori (poriferi, policheti e macroalghe; vasca A, IMTA), una vasca controllo (in duplicato) contenente solo orate (vasca C) ed una terza vasca contenente i biorisanatori (vasca B) che veniva "alimentata" con l'acqua proveniente da una vasca controllo (Figura 3.1.C).

I biorisanatori in ogni vasca sperimentale sono stati dislocati come di seguito specificato (Figura 3.1.D):

- N. 6 supporti contenti poriferi disposti in due filari;
- Una rete contenente n.50 esemplari di *Sabella*;
- N. 3 retine contenenti la macroalga.

I supporti in cui sono stati posizionati gli espianti di spugna avevano una dimensione di 30x15x10 cm (Figura 3.1.E). La nassa a doppio strato in cui sono stati posizionati i policheti aveva un diametro complessivo di 30 cm ed un'altezza di 50 cm (Figura 3.1.F); la retina in cui sono state collocate le alghe aveva una lunghezza di 30 cm ed un diametro di circa 10 cm (Figura 3.1.G).

Le spugne sono state sospese nelle vasche sperimentali legandole con una cima al bordo vasca, la nassa con i policheti è stata immersa al centro della vasca e le retine con la macroalga sono state legate in superficie a pochi cm di profondità (Figura 3.1.H).

Le vasche sperimentali sono state allestite come di seguito descritto (Figura 3.1.I):

- Vasca A: orate + biorisanatori
- Vasca B: biorisanatori
- Vasca C (in duplicato): orate

Il piano di campionamento ha previsto il monitoraggio dei biorisanatori ed il monitoraggio dell'acqua nelle vasche sperimentali come riportato in Tabella 3.1.a.

I campioni di acqua raccolti ad ogni tempo di campionamento (T0, T1, T2, T3) nei due esperimenti, sono stati trasferiti in appositi contenitori refrigerati presso i laboratori del Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente dell'Università di Bari dove sono stati analizzati dai gruppi di ricerca delle sezioni di Zoologia, Biologia vegetale e Microbiologia.



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
PO 2014-2020
Fondo europeo per lo
sviluppo regionale e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI SALI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023



Figura 3.1.A – Siti di raccolta nei mari interni tarantini (Mar Piccolo, Mar Grande e Golfo di Taranto) delle biomasse di invertebrati e macroalghe utilizzate per la sperimentazione (Immagine modificata dal software Google Earth Pro, 2023).



Figura 3.1.B – Raccolta degli esemplari di *Hymeniacion perlevis* (in alto) e *Sabella spallanzanii* (in basso) dai fondali del Mar Piccolo di Taranto e contenitori per il trasporto presso COISPA Tecnologia & Ricerca.

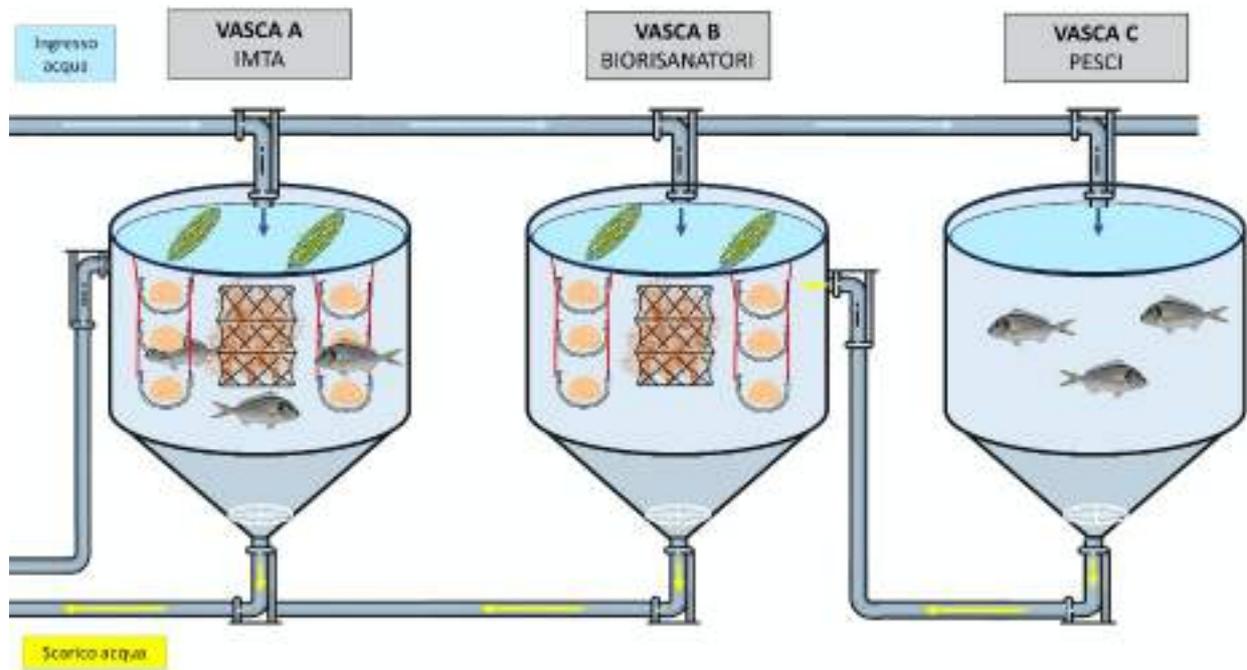


Figura 3.1.C – Disegno schematico delle vasche sperimentali di biorisanamento: Vasca A con orate e biorisanatori (poriferi, policheti e alghe); Vasca C (in duplicato) contenenti solo con orate; Vasca B solo biorisanatori.

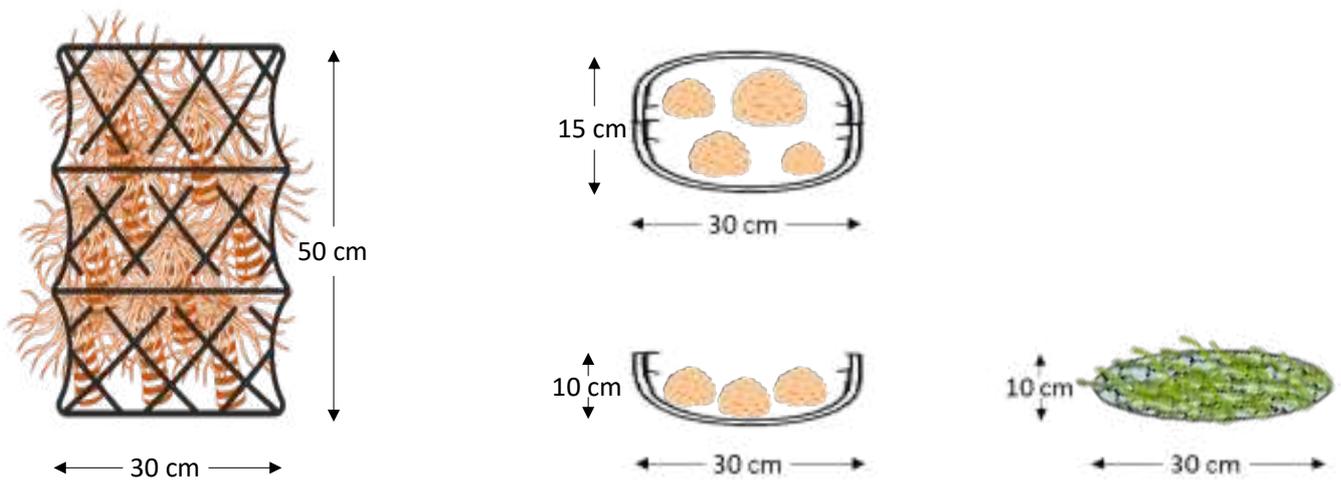


Figura 3.1.D – Disegno schematico di dettaglio dei supporti utilizzati per i biorisanatori. Da sinistra: nassa per i policheti; supporti per le spugne, retina per le macroalghe.



Figura 3.1.E – A sinistra dettaglio di un supporto con gli espanti di spugna e a destra il posizionamento in una vasca sperimentale.

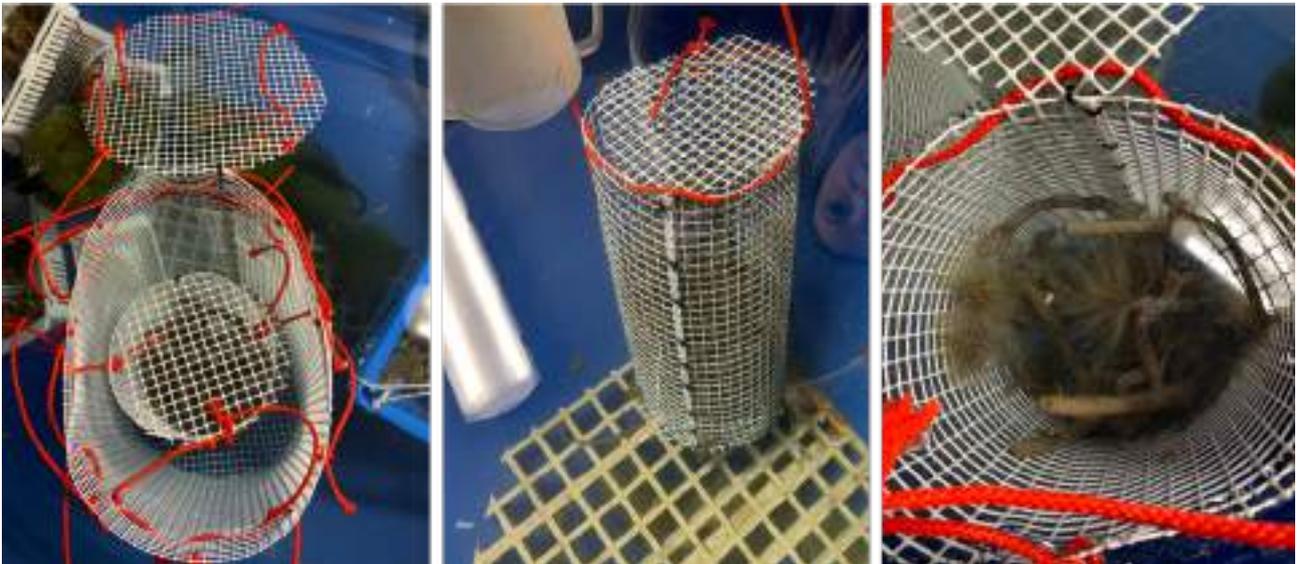


Figura 3.1.F - Nassa a doppio strato in cui sono stati posizionati i policheti.

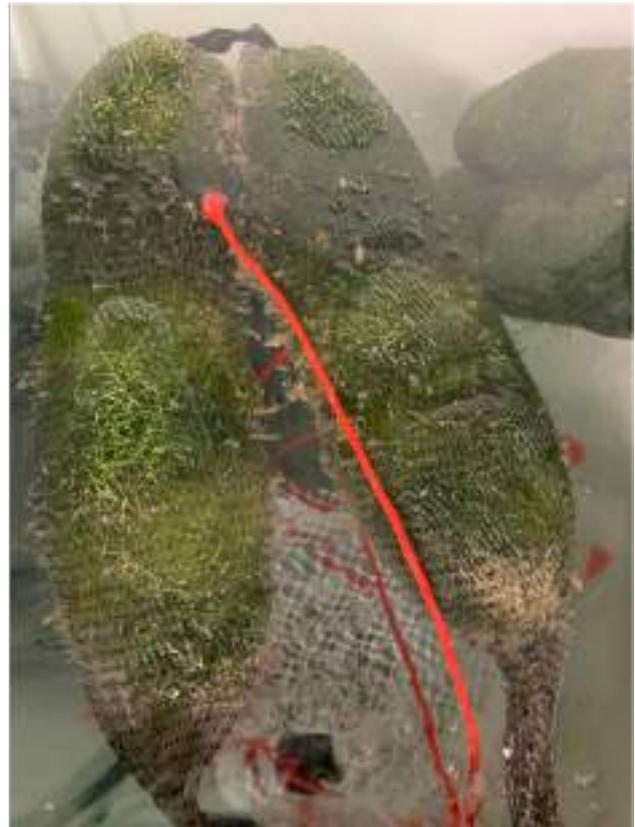


Figura 3.1.G – A sinistra la macroalga *Chaetomorpha linum* e a destra alcune retine allestite per la sperimentazione.

Tabella 3.1.a – Piano di campionamento con i parametri relativi ai biorisanatori e all’acqua nei due esperimenti condotti presso la COISPA Tecnologia & Ricerca.

		MONITORAGGIO	1° ESPERIMENTO					2° ESPERIMENTO								
			acclimatazione	T0	T1	T2	T3	acclimatazione	T0	T1	T2	T3				
			04/11/22	18/11/22	26/11/22	09/12/22	12/12/22	19/12/22	09/01/23	16/01/23	27/01/23	09/02/23	13/02/23	20/02/23	27/02/23	
BIORISANATORI	FORFERI	Volume (ml)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	POLICHETI	n°	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
	ALGHE	Peso (g)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
		Clorofilla a (CH a)						✓							✓	
		Clorofilla b (CH b)						✓							✓	
		Carotenoidi						✓							✓	
	Malonadeide (MDA)													✓		
ACQUA	NUTRENTI	NUTRENTI													✓	
		FOSFATI			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		NITRITI			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		NITRATI			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		AMMONIO			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		Sales Sospesi Totali (STM)			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
	PARAMETRI MICROBIOLOGICI	VIBRIONACEE			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		COLIFORME			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		ENTEROCOCCI			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓
		ETEROTROFI MARINI			✓	✓	✓	✓					✓	✓	✓	✓



Figura 3.1.H – Alcune fasi dell’allestimento delle vasche sperimentali con i biorisanatori.



Figura 3.1.I – Vasca sperimentale con orate e biorisanatori in cui sono visibili alcuni supporti contenenti le spugne e la nassa con i policheti.

3.2 Monitoraggio del benessere degli organismi biorisanatori

3.2.1 Valutazione dello stato di salute degli invertebrati

Con cadenza settimanale tutti gli espianti di spugna ed i policheti sono stati monitorati per valutarne lo stato di salute.

Il benessere degli espianti di spugna è stato valutato mediante l'osservazione visiva delle superfici di taglio. Nel caso di superfici completamente rimarginate e assenza di fattori di stress (presenza di aree necrotiche o tessuto scheletrico esposto) i frammenti di spugna sono stati considerati in buono stato, mentre quelli con evidenti segni di stress sono stati considerati danneggiati.

Il volume degli espianti è stato misurato inserendoli singolarmente in un beaker graduato riempito con acqua di mare. Questo metodo permette di tenere i frammenti fuori dall'acqua solo per pochi secondi, limitandone così lo stress. Dopo la misurazione le spugne sono state reinserte all'interno dei supporti da cui sono stati prelevati e riposizionati nelle vasche sperimentali.

I policheti sono stati controllati ed è stata valutata la reazione di retrazione della corona branchiale nel tubo o l'eventuale assenza. I vermi hanno sempre rivelato una reattività ed una pronta risposta alla sollecitazione, segno di buona salute. Durante la fase iniziale di allestimento delle vasche sperimentali è stata utilizzata una nassa a singola camera da cui fuoriuscivano i ciuffi branchiali dei policheti che sono stati apprezzati dalle orate. Per limitare la predazione sono state quindi predisposte nasse a doppio strato.

Gli espianti di spugna posizionati nella Vasca A (pesci + biorisanatori), in entrambe gli esperimenti, hanno mostrato un iniziale lieve decremento in volume, plausibilmente dovuto al trasporto e alla manipolazione, a cui è seguito un incremento che nel secondo esperimento è risultato più evidente (Figura 3.2.A). Nella Vasca A del secondo esperimento, infatti, *H. perlevis* ha fatto registrare un incremento in volume del 3% rispetto a quello iniziale, in soli 3 settimane di esperimento (T2) (Figura 3.2.A). Gli espianti della Vasca B, invece non hanno fatto registrare lo stesso trend, probabilmente dovuto alla scarsa quantità di «alimento» disponibile.

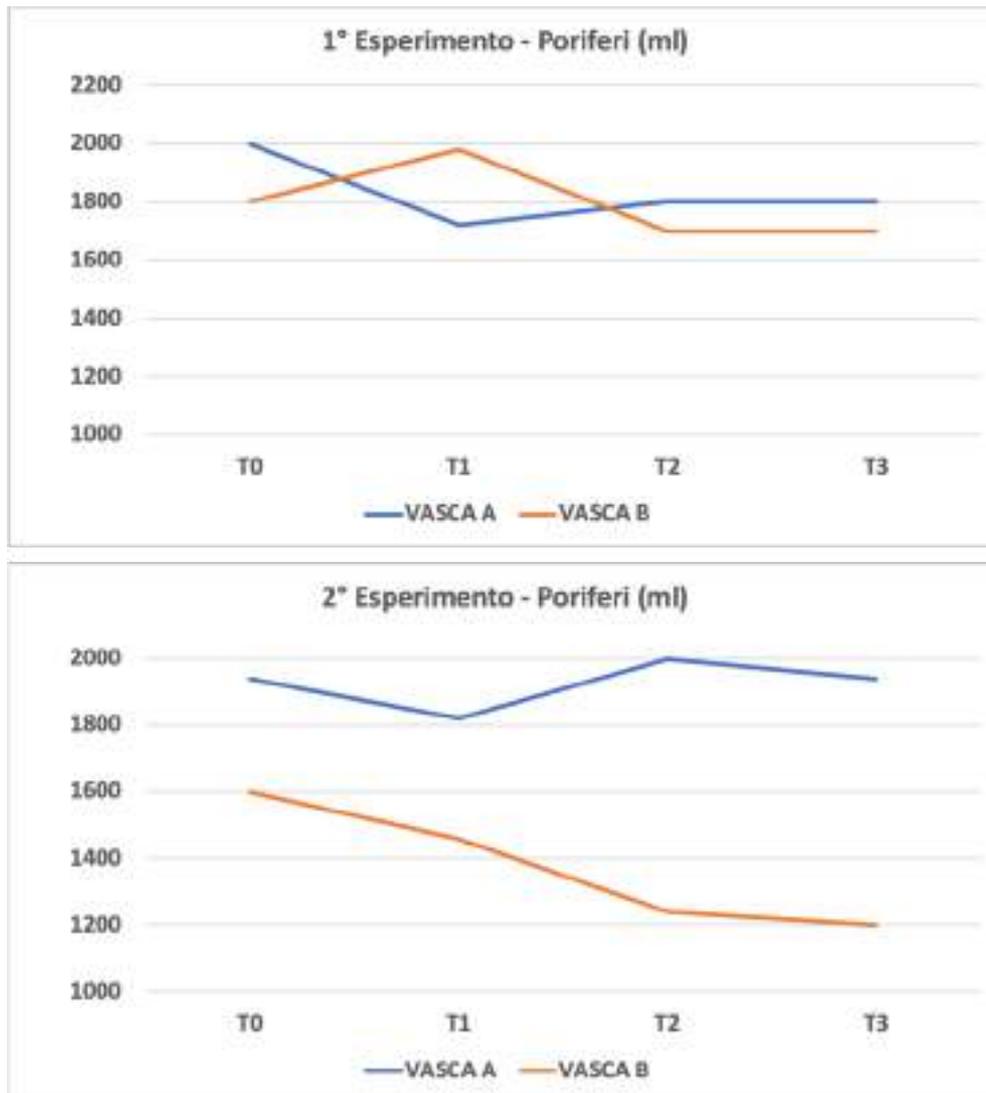


Figura 3.2.A – Andamento del volume degli espianti di spugne nella vasca A e nella vasca B nel corso dei due esperimenti.

3.2.2. *Analisi degli indicatori di stress e contenuto di pigmenti fotosintetici nella macroalga*

La valutazione dello stato di adattamento delle colture algali alle condizioni sperimentali impiegate è stata effettuata mediante monitoraggio del contenuto di pigmenti (clorofilla a, b e carotenoidi) ed analizzando i valori relativi ad un importante marker di stress, il malonaldeide (MDA). I campioni algali raccolti provenivano da due vasche di crescita, A e B, come descritto in precedenza, con l'aggiunta di un elemento di controllo relativo ad una aliquota algale raccolta in condizioni naturali all'avvio dell'esperimento.

In dettaglio, il contenuto di pigmenti fotosintetici (clorofilla a, b e carotenoidi) utilizzando aliquote di tessuto fogliare del peso approssimativo di 80 mg polverizzate in azoto liquido e conservate a -80°C.

Metodologie di analisi

Le analisi sono state condotte considerando tre replicati sperimentali per ciascun replicato biologico (n=6) ed è stato utilizzato il protocollo di Wellburn (1994), il quale prevede l'utilizzo di una soluzione di acetone all'80% (1,8 ml per campione) che consente la solubilizzazione dei pigmenti. I campioni sono stati messi in agitazione a 1500 rpm per 45 minuti, a 7°C, centrifugati a 10000 g per 20 minuti (4°C) ed il sovrantante ottenuto è stato trasferito in nuove microprovette.

L'analisi spettrofotometrica è stata condotta utilizzando le seguenti lunghezze d'onda: $\lambda=663,2$ nm (clorofilla A); $\lambda=646,8$ nm (clorofilla B); $\lambda=470$ nm (carotenoidi).

La quantificazione dei pigmenti è avvenuta applicando le formule riportate nel lavoro di Zhang & Kirkham (1996):

- Clorofilla a = $(12,25 \times \text{Abs. } 663,2 \text{ nm}) - (2,79 \times \text{Ass. } 648,8 \text{ nm})$
- Clorofilla b = $(21,50 \times \text{Abs. } 646,8 \text{ nm}) - (5,10 \times \text{Ass. } 663,2 \text{ nm})$
- Carotenoidi = $[(1000 \times \text{Abs } 470,0 \text{ nm}) - (1,82 \times \text{clorofilla a}) - (85,02 \times \text{clorofilla b})]/198$.

I valori ottenuti, moltiplicati per il fattore di diluizione, esprimono il contenuto di pigmenti in μg su mL di estratto. Tali valori sono stati successivamente rapportati al volume di sovrantante recuperato e al peso delle rispettive aliquote di tessuto fogliare, ottenendo il valore del contenuto di pigmenti fotosintetici in $\mu\text{g}/\text{mg}$ di peso fresco.

La determinazione dei marker di stress è stata effettuata analizzando i livelli di perossidazione lipidica, attraverso quantificazione del contenuto di malondialdeide (MDA), ottenuta dalla reazione con l'acido tiobarbiturico (TBA) secondo il metodo di Heath & Packer (1968) opportunamente modificato. La determinazione spettrofotometrica è stata effettuata leggendo l'assorbanza a 532 (assorbanza specifica) e 600 nm (assorbanza aspecifica). I risultati ottenuti sono stati elaborati statisticamente mediante analisi ANOVA ad una via seguita da post-test (Dunnet's test, 1955), utilizzando il campione di controllo come riferimento.

Risultati

Analizzando nel dettaglio i risultati riportati in Figura 1, possiamo osservare come il contenuto di clorofille (a, b) risulti essere inferiore nei campioni raccolti nelle due vasche rispetto al campione di controllo, come confermato dai risultati dell'analisi statistica (ANOVA ad una via). Tale dato viene confermato dall'analisi del contenuto di carotenoidi, con una riduzione del contenuto nei campioni A e B rispetto al controllo, pur risultando statisticamente significativo solo in uno dei due confronti (Figura 3.2.B). Analizzando invece i risultati relativi ai marker di stress e di attività metabolica, possiamo notare come la determinazione nel contenuto di malonaldeide, un importante marcatore utile per valutare lo stato di perossidazione lipidica e conseguente liberazione di radicali idrossilici. I risultati riportati in Figura 3.2.C indicano come i valori registrati nelle alghe raccolte nelle vasche A e B (rispettivamente Tank A e Tank B) risultino essere sensibilmente superiori rispetto ai valori del campione di controllo (Control). Tale incremento risulta essere sensibilmente superiore nei campioni raccolti nella vasca A, rappresentando un possibile indice di una attività metabolica particolarmente intensa.

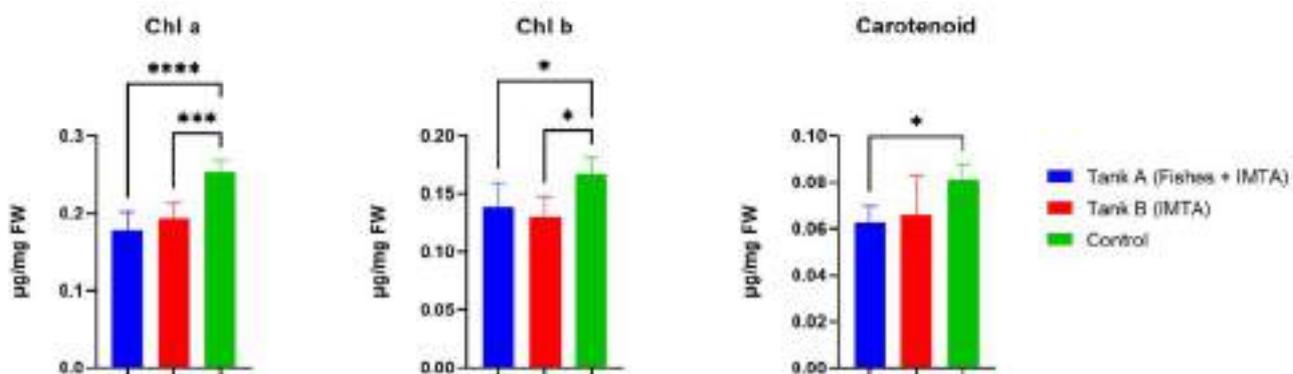


Figura 3.2.B – Contenuto di clorofilla a, b (Chl a, Chl b) e carotenoidi (Carotenoid) nei campioni algali riconducibili alle tre condizioni sperimentali analizzate. Le analisi statistiche sono state condotte mediante test ANOVA ad una via + post test (Dunnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 p-value.

Perossidazione lipidica (MDA)

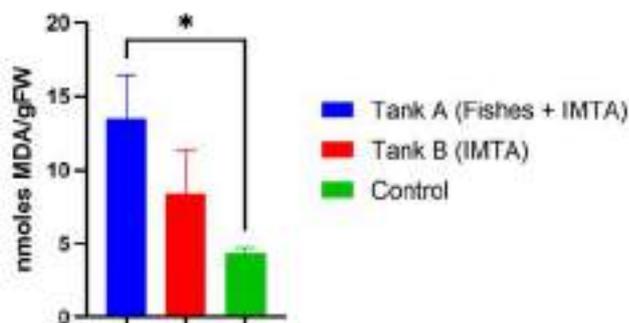


Figura 3.2.C – Contenuto di MDA (malonaldeide) nei campioni algali riconducibili alle tre condizioni sperimentali analizzate. Le analisi statistiche sono state condotte mediante test ANOVA ad una via + post test (Dunnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 p-value.

3.3 Monitoraggio delle *performance* di biorisanamento

3.3.1. *Analisi del contenuto di nutrienti (sali di azoto e fosforo) nelle acque*

Il monitoraggio delle *performance* di biorisanamento associate all'impiego delle biomasse algali è stato effettuato analizzando i campioni di acque raccolti a cadenza settimanale nelle tre vasche impiegate per la sperimentazione, vasca A (pesci + biorisanatori), vasca B (solo biorisanatori) e vasca C (solo pesci). La valutazione del potenziale di fitodepurazione è stata condotta attraverso due esperimenti consecutivi, differenziabili per la sostituzione dei biorisanatori avvenuta nel secondo esperimento, effettuata per monitorare il comportamento dei biorisanatori stessi in presenza di condizioni di stress più impattanti, legate all'assenza di una fase di acclimatazione alle condizioni di crescita controllate.

Dal punto di vista operativo, la vasca A era totalmente indipendente dalle altre due, mentre le vasche B e C erano collegate tra loro, consentendo il passaggio, con tempistiche prestabilite, dell'acqua della vasca B all'interno della vasca C.

Metodologia di analisi

La valutazione della qualità delle acque è stata quindi condotta valutando il contenuto di ammonio, nitriti e nitrati, impiegando 3 specifici kit: Ammonia Assay Kit (AA0100, Sigma Aldrich) che prevede la lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 340 nm, Malachite Green Phosphate Assay Kit (MAK307, Sigma Aldrich) che prevede la lettura dell'assorbanza al multiplate reader a 620 nm, e infine il Nitrite/Nitrate Assay Kit, colorimetric (23479, Sigma Aldrich), basato sulla reazione di Griess, con lettura dell'assorbanza al multiplate reader a 540 nm.

Risultati

I risultati riportati in Figura 3.3.A relativi al primo esperimento (colonna di sinistra) mostrano lievi differenze nel contenuto di fosfati, generalmente superiore nel campione proveniente dalla vasca C, mentre non sono state registrate differenze nel contenuto di nitriti. Una tendenza opposta è stata registrata analizzando il contenuto di nitrati del secondo esperimento, risultato essere più alto nei campioni raccolti nella vasca A, in particolare al T3. Passando ai risultati ottenuti nel secondo esperimento, possiamo notare come il contenuto di fosfati tenda ad aumentare nei campioni raccolti nella vasca B, per poi diminuire al termine dell'esperimento. Tale elemento conferma la capacità degli IMTA di ridurre le possibili contaminazioni anche in presenza di condizioni di stress più impattanti, quali l'assenza di una fase di acclimatazione. Tale risultato viene parzialmente confermato osservando i risultati relativi al contenuto, superiori di un 20% nei campioni raccolti nella vasca B. Passando all'ultimo dato riportato in Figura 3.3.A, il contenuto di nitrati del secondo esperimento, in questo caso i risultati indicano un incremento in T3 nei campioni raccolti in vasca C, probabilmente riconducibile alla presenza di sostanze di scarto prodotte dai pesci.

Per quanto riguarda il contenuto di ammonio, possiamo osservare come i risultati ottenuti ricalchino quanto ottenuto in precedenza tramite determinazione dei fosfati (Figura 3.3.B). Il contenuto di ammonio risulta infatti essere più alto nei campioni raccolti nel secondo esperimento (vasca B), per poi diminuire al termine dell'esperimento stesso, confermando una buona capacità di rimozione dei contaminanti operata dagli IMTA in condizioni non ottimali.

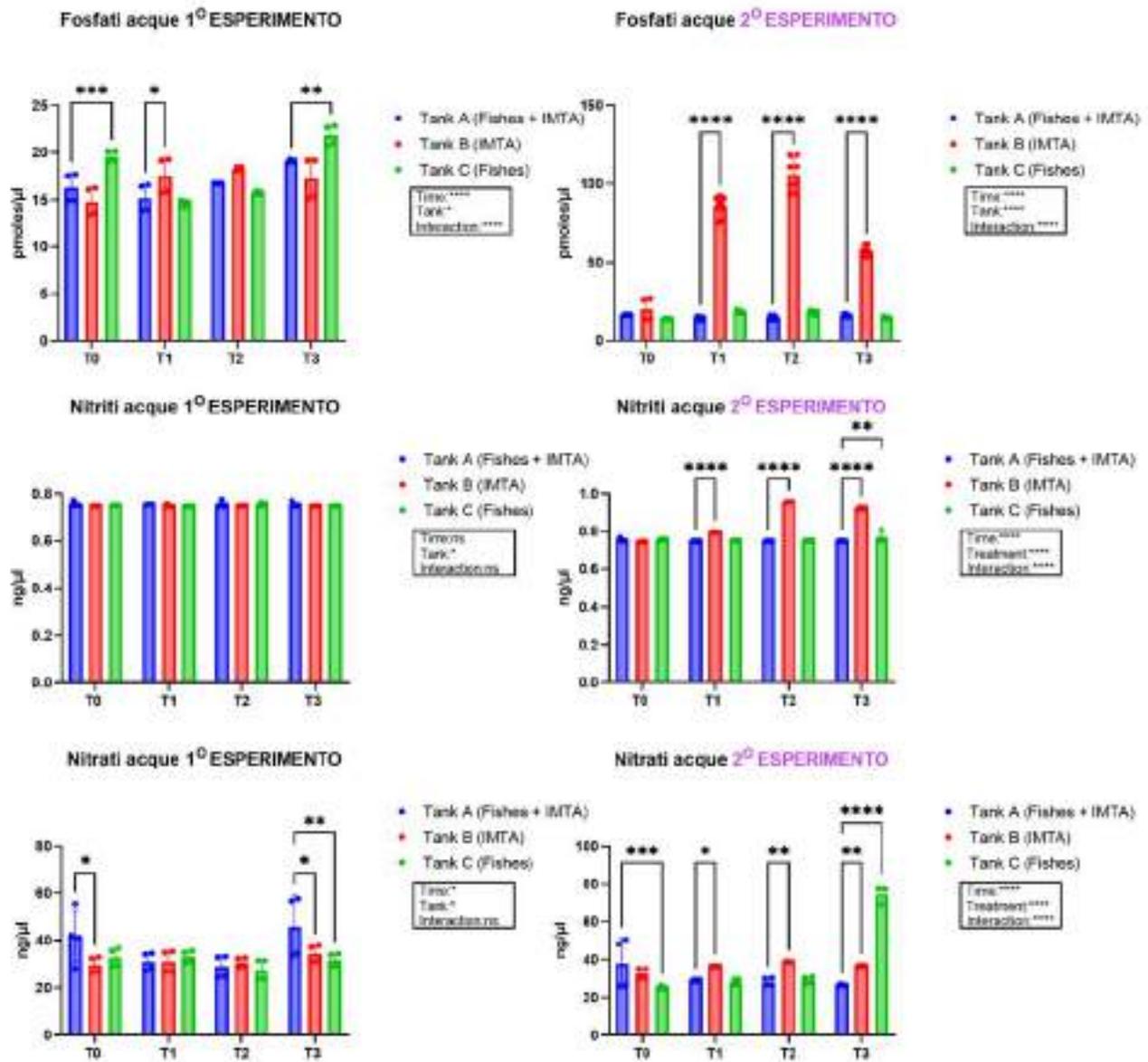


Figura 3.3.A – Contenuto di nitriti e nitrati nei campioni di acque raccolti a cadenza settimanale nelle tre vasche di sperimentazioni. Dati riconducibili ai due esperimenti successivi. Le analisi statistiche sono state condotte mediante test ANOVA a due vie (fattore 1, trattamento; Fattore 2, tempo) + post test (Dunnnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 p-value.

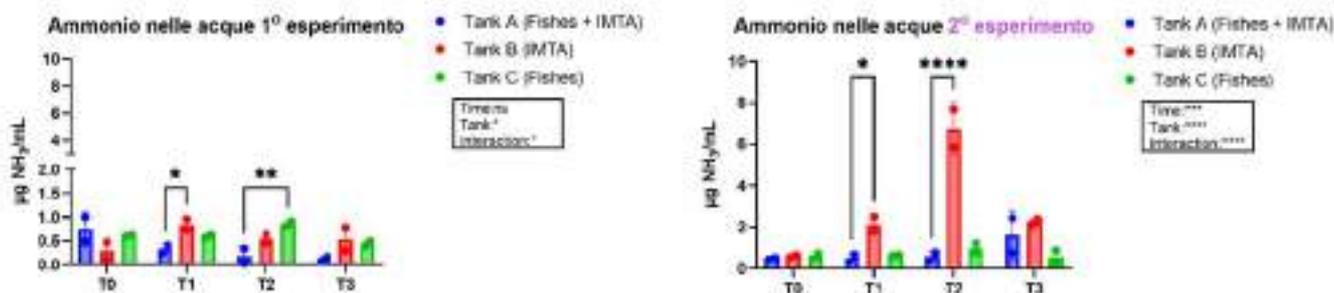


Figura 3.3.B – Contenuto di ammonio nei campioni di acque raccolti a cadenza settimanale nelle tre vasche di sperimentazioni. Dati riconducibili ai due esperimenti successivi. Le analisi statistiche sono state condotte mediante test ANOVA a due vie (fattore 1, trattamento; Fattore 2, tempo) + post test (Dunnnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 p -value

3.3.2. Analisi del contenuto di nutrienti (sali di azoto e fosforo) nella macroalga

Le *performance* legate alla capacità di fitodepurazione delle acque sono state valutate su estratti algali raccolti al termine della seconda fase sperimentale. In dettaglio, sono stati valutati i contenuti di nitriti, nitrati ed ammonio nei campioni algali raccolti nelle vasche A e B e nel campione di controllo, quest'ultimo riconducibile ad una aliquota di materiale raccolto in ambiente naturale durante le prime fasi dell'esperimento. La determinazione dei composti precedentemente citati è stata effettuata impiegando i medesimi protocolli utilizzati per l'analisi delle acque, con l'obiettivo di standardizzare e migliorare la riproducibilità dei dati.

Risultati

Osservando i dati riportati in Figura 3.3.C, possiamo notare come il contenuto di nitrati risulti inferiore nei campioni raccolti nella vasca A rispetto al controllo, come confermato dai risultati dell'analisi statistica. Un trend opposto è stato invece registrato per quanto riguarda invece il contenuto di nitriti, che risulta essere superiore rispetto ai campioni raccolti nella vasca B e nel controllo, indice del fatto che è possibile riscontrare un certo accumulo di nitriti nella vasca caratterizzata da un maggior grado di diversità biotipica. Tale risultato viene confermato analizzando i risultati riportati in Figura 3.3.D relativi al contenuto di fosfati. In questo caso, i risultati mostrano come i campioni raccolti in entrambe le vasche presentino un titolo di fosforo molto superiore rispetto a quanto riscontrato nel controllo, ovvero il campione non impiegato per le analisi di fitorimediale. Passando all'ultimo dato misurato, l'ammonio, i risultati riportati in Figura 3.3.E mostrano una tendenza comparabile con i livelli di nitrato precedentemente descritti, indice di un possibile incremento di fonti azotate utili per la produzione di biomassa utile per il mantenimento della rete trofica.

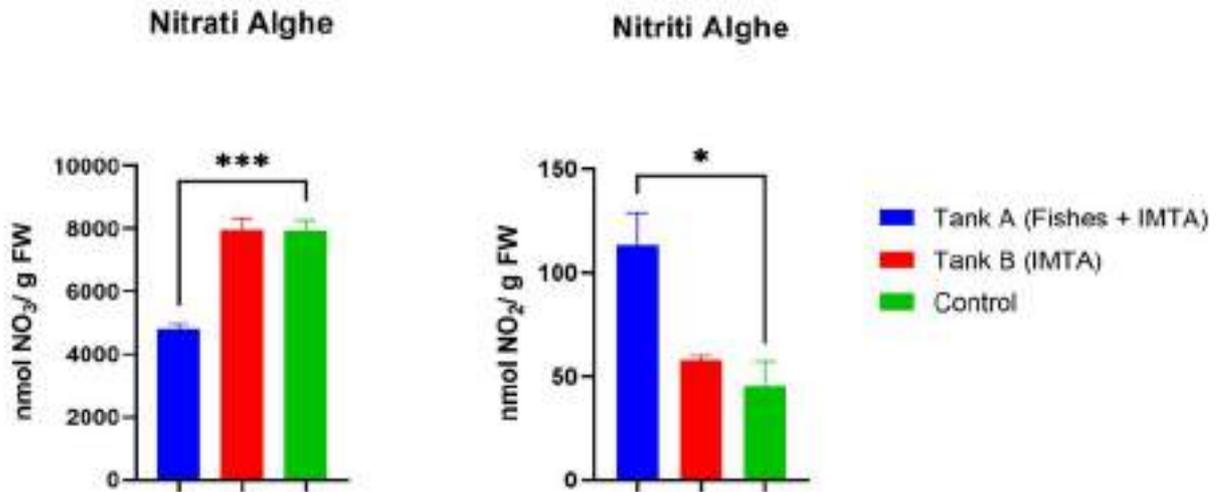


Figura 3.3.C – Contenuto di nitriti e nitrati nei campioni algali riconducibili alle tre condizioni sperimentali analizzate. Le analisi statistiche sono state condotte mediante ANOVA ad una via + post test (Dunnnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 *p*-value.

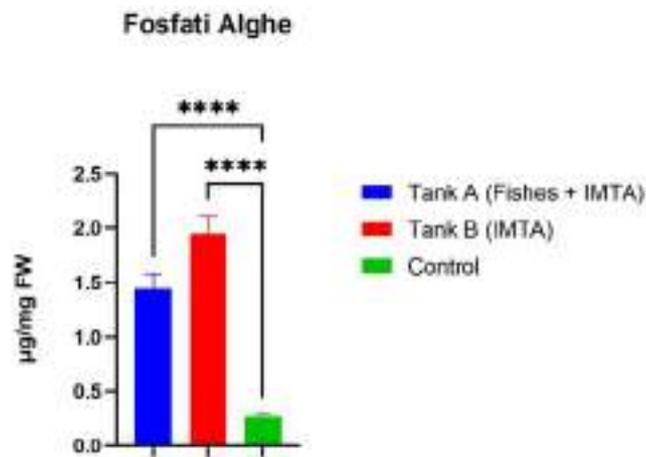


Figura 3.3.D – Contenuto di fosfati nei campioni algali riconducibili alle tre condizioni sperimentali analizzate. Le analisi statistiche sono state condotte mediante test ANOVA ad una via + post test (Dunnnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 *p*-value.

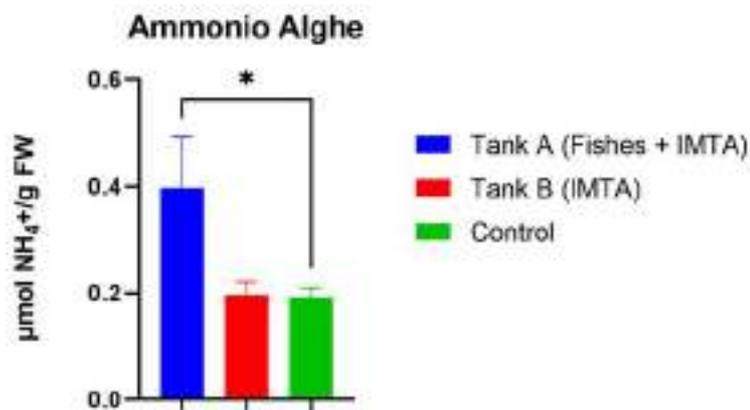


Figura 3.3.E – Contenuto di ammonio nei campioni algali riconducibili alle tre condizioni sperimentali analizzate. Le analisi statistiche sono state condotte mediante test ANOVA ad una via + post test (Dunnnett's test, 1955). **** < 0.0001 *** < 0.001 ** < 0.01 * < 0.05 *p*-value.

Discussione dei risultati ottenuti

I risultati ottenuti in seguito alla determinazione di pigmenti e marker di stress mostrano come le biomasse algali si siano positivamente adattate alle condizioni di crescita in ambiente controllato. La quantificazione dei pigmenti fotosintetici indica come i valori ottenuti risultino essere di poco inferiori al campione di Controllo, cioè raccolto in condizioni naturali durante le fasi iniziali dell'esperimento. Tale risultato viene confermato dai valori di MDA registrati, in cui i valori di perossidazione lipidica risultano essere superiori nei campioni raccolti nella vasca A. Passando ai risultati relativi alle analisi delle acque, i due esperimenti condotti mostrano come i campioni raccolti nelle tre vasche presentino alcune differenze, in particolare per quanto riguarda il secondo esperimento, dove è stata saggiata la capacità dei biorisanatori di rimuovere elementi nocivi per la sopravvivenza dei pesci, quali nitriti e nitrati, anche in condizioni di stress. La capacità di immagazzinamento dei contaminanti nella biomassa algale viene inoltre confermata dall'analisi del contenuto di ammonio, nitrati e fosfati nei campioni, in cui i valori riscontrati risultano essere generalmente superiori nei campioni raccolti nella vasca A rispetto al controllo, con la sola eccezione rappresentata dal contenuto di nitrati, più basso nei campioni raccolti nella vasca A rispetto al Controllo ed ai campioni raccolti nella vasca B.

3.3.3. Analisi della componente microbiologica

È stata monitorata la carica batterica vitale coltivabile di gruppi batterici maggiormente attenzionati per quanto concerne la qualità dell'acqua, sia perché potenzialmente patogeni per i pesci in allevamento (*Vibrionaceae*) (Rønneseth, et al. 2017) che per il possibile impatto ambientale delle acque di scarico (*Escherichia coli*, coliformi ed Enterococchi) avvalendosi anche dei riferimenti EN ISO 9308-2 e EN ISO 7899-2. Per completezza, è stata considerata anche la carica batterica coltivabile totale (eterotrofi marini).

Piano di campionamento

Il monitoraggio per l'identificazione di Vibrionaceae, *E. coli*, coliformi ed enterococchi ha previsto campionamenti di acqua dalle tre vasche dell'impianto con frequenza settimanale nei mesi di dicembre 2022 e di febbraio 2023. Nel complesso sono stati collezionati i dati relativi a otto settimane. Per quanto riguarda gli eterotrofi marini, il monitoraggio ha riguardato le tre settimane del mese di febbraio. Nel caso in cui, allo scopo di monitorare la carica batterica lungo tutta la colonna d'acqua, da una vasca siano stati prelevati due campioni (uno da circa 15 cm dal fondo della vasca e l'altro da circa 30 cm dalla superficie), nella valutazione complessiva dei dati sono stati considerati i valori medi delle conte vitali per ciascun campione.

Allo scopo di valutare l'eventuale effetto di biorisanamento batterico in un sistema chiuso, è stata anche monitorata la carica batterica coltivabile della vasca contenente solo i biorisanatori (vasca B) per la quale è stato mantenuto chiuso il rubinetto di comunicazione con la vasca C dal momento immediatamente successivo allo scarico giornaliero fino alla fine dell'esperimento.

I campioni sono stati collezionati in modo sterile, trasportati in laboratorio a temperatura controllata (4°C - 8°C) e immediatamente processati. Sono stati raccolti campioni di acqua da 1 litro, i quali sono stati opportunamente diluiti (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) e utilizzati sia per la semina diretta (mediante distribuzione uniforme di 100 microlitri di ciascun campione sulla superficie del terreno di crescita) che per la filtrazione secondo quanto di seguito dettagliato.

Metodologie di analisi

Il monitoraggio delle Vibrionaceae coltivabili è stato eseguito mediante semina diretta su piastre Petri (diametro 9 cm) contenenti il terreno selettivo e differenziale TCBS (Tiosolfato Citrato Bile Saccarosio) (OXOID CM0333) (Uchiyama, 2000) addizionato con NaCl al 2%; il monitoraggio di *E. coli* e coliformi è stato eseguito mediante filtrazione (attraverso una pompa da vuoto) di 100 ml di acqua su membrana con porosità 0,45µm e deposito del filtro su piastre Petri (diametro 4,5cm) contenenti il terreno selettivo e differenziale Brilliance (OXOID CM1046) (avvalendosi anche del riferimento ISO 9308-1:2014) addizionato con NaCl al 2%; la ricerca degli enterococchi è stata fatta mediante la stessa procedura descritta per *E. coli* e coliformi utilizzando il terreno selettivo e differenziale Slanetz & Bartley (OXOID CM0377) (avvalendosi del anche riferimento ISO 7899-2:2000) addizionato con NaCl al 2%; la presenza di eterotrofi marini è stata determinata mediante semina diretta su piastre Petri (diametro 9 cm) contenenti terreno ricco Marine Agar (Difco 2216). Nel caso di Vibrionaceae, *E. coli*, coliformi ed eterotrofi le piastre sono state osservate dopo incubazione a 37°C per 24h; nel caso degli enterococchi le piastre sono state osservate dopo incubazione a 37°C per 48h. La conta vitale è stata eseguita mediante conteggio delle colonie con morfologia simile e coerente con quanto indicato sulla scheda tecnica di ciascun terreno utilizzato.



Risultati

I risultati delle conte vitali dei gruppi batterici identificati nelle vasche A, B e C nei due esperimenti, sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 3.3.a,b,c. La rappresentazione grafica dei valori riportati nelle tabelle è mostrata nelle Figure 3.3.F, G, H.

Nella vasca A, con pesci e biorisanatori, è stato registrato un decremento, seppur con un *trend* irregolare e discontinuo, nelle conte vitali dei parametri microbiologici considerati al termine di entrambe gli esperimenti (Tabella 3.3.a; Figura 3.3.F).

Tabella 3.3.a - Conte vitali nella vasca A

cfu/ml Vasca A								
	1° ESPERIMENTO				2° ESPERIMENTO			
	TO	T1	T2	T3	TO	T1	T2	T3
Vibrionaceae	70	230	30	60	25	65	1200	14
<i>E. coli</i> , coliformi	1600	16000	17000	460	3500	6400	2000	0
Enterococchi	0	0	0	0	13	0	0	0
Eterotrofi	nd	nd	nd	nd	11150	200	470	300

Tabella 3.3.b - Conte vitali nella vasca B

cfu/ml Vasca B								
	1° ESPERIMENTO				2° ESPERIMENTO			
	TO	T1	T2	T3	TO	T1	T2	T3
Vibrionaceae	70	20	30	0	0	20	0	27
<i>E. coli</i> , coliformi	5100	ND	0	170	15	4400	2400	0
Enterococchi	0	0	0	0	0	0	0	0
Eterotrofi	nd	nd	nd	nd	25	800	880	4640

Tabella 3.3.c - Conte vitali nella vasca C

cfu/ml Vasca C								
	1° ESPERIMENTO				2° ESPERIMENTO			
	TO	T1	T2	T3	TO	T1	T2	T3
Vibrionaceae	50	140	0	0	0	50	40	0
<i>E. coli</i> , coliformi	13000	1300	nd	nd	400	6000	850	3400
Enterococchi	0	0	0	0	0	0	0	0
Eterotrofi	nd	nd	nd	nd	nd	450	90	320

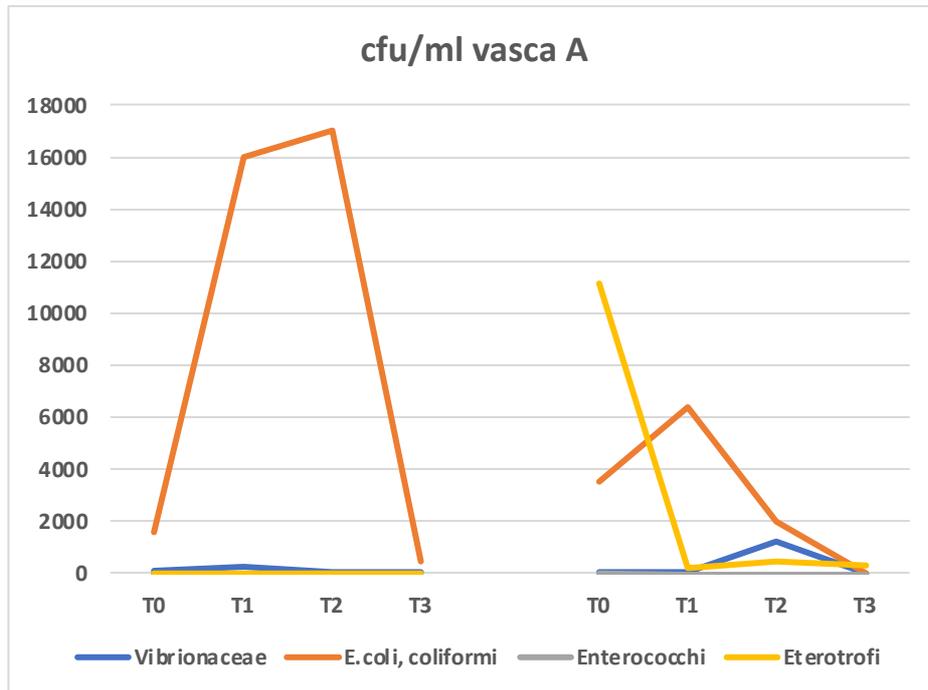


Figura 3.3.F - Rappresentazione grafica delle conte vitali nella vasca A nel corso del primo (sinistra) e del secondo esperimento (destra).

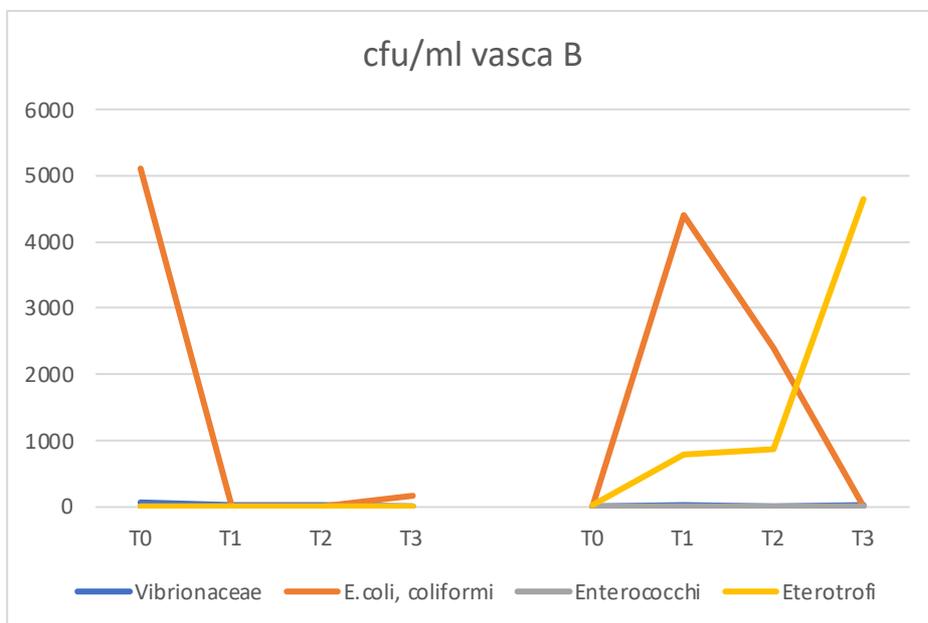


Figura 3.3.G - Rappresentazione grafica delle conte vitali nella vasca B nel corso del primo (sinistra) e del secondo esperimento (destra).

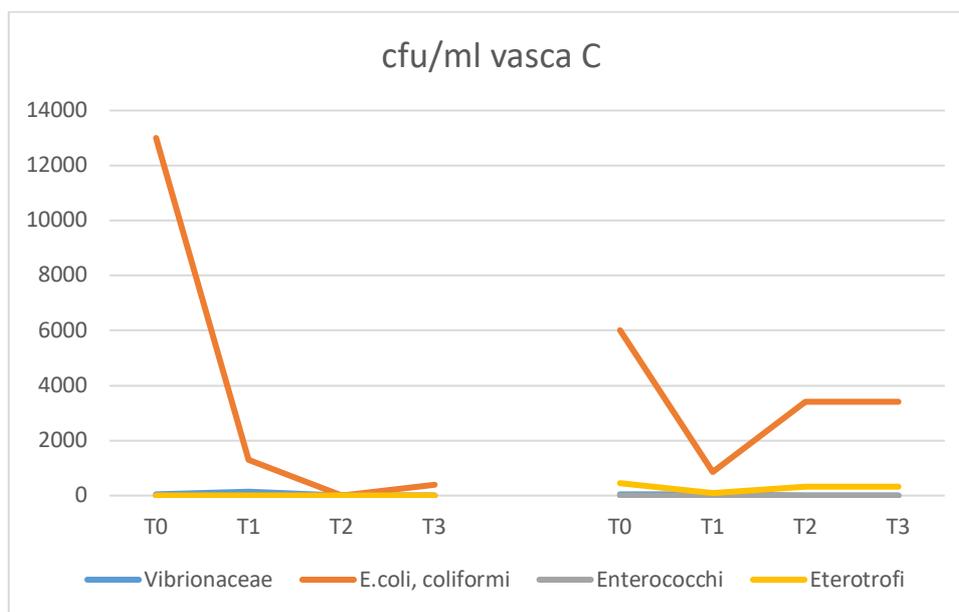


Figura 3.3.H - Rappresentazione grafica delle conte vitali nelle vasche C nel corso del primo (sinistra) e del secondo esperimento (destra).

Ulteriori dati sulla capacità di biorisanamento del sistema testato presso la COISPA sono stati acquisiti monitorando la carica batterica vitale coltivabile nella vasca B in cui è stato chiuso lo scarico per tre giorni e sono stati effettuati campionamenti di acqua secondo il seguente schema:

- t0: prima dell'immissione di acqua proveniente dalla vasca C
- t1: Subito dopo l'immissione di acqua proveniente dalla vasca C
- t2: 3 ore dopo
- t3: 6 ore dopo
- t4: 24 ore dopo
- t5: 48 ore dopo

La conta vitale di *Vibriionaceae*, *E. coli* e coliformi ed eterotrofi nella vasca B chiusa ha consentito di raccogliere dati che evidenziano un'attività di bioremediazione da parte dei biorisanatori, probabilmente differenziata. Infatti, già dopo 3 ore dalla chiusura della vasca, l'andamento delle conte vitali di *Vibriionaceae*, *E. coli* e coliformi (Tabella 3.3.d; Figura 3.3.I) mostrano bioremediazione batterica solo a carico delle *Vibriionaceae*, mentre, dopo 24h si osserva l'inizio di bioremediazione batterica anche di *E. coli* e coliformi. La conta vitale degli eterotrofi non evidenzia diminuzione, almeno nel tempo di durata dell'esperimento.

Tabella 3.3.2d - Conte vitali della vasca B chiusa per 3 giorni (cfu/ml).

	Vibrionaceae	<i>E.coli</i> , coliformi	Eterotrofi
t0	20	3000	600
t1	130	1800	480
t2	120	2000	450
t3	0	3000	270
t4	20	330	740
t5	0	150	1300

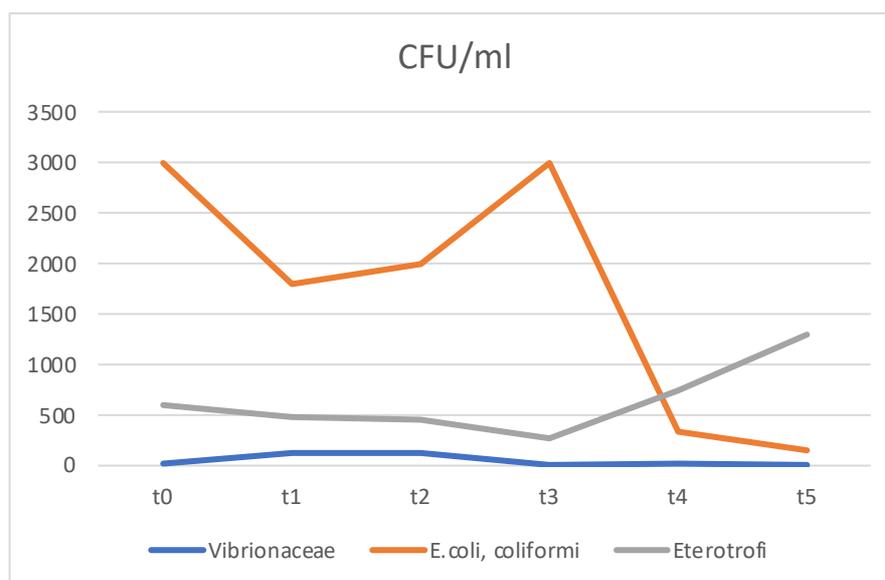


Figura 3.3.I - Rappresentazione grafica delle conte vitali della vasca B chiusa per 3 giorni.

Le analisi batteriologiche condotte sull'acqua dell'impianto sperimentato presso la COISPA Tecnologia & Ricerca hanno permesso di concludere che sebbene nella vasca A, con pesci ed organismi biorisanatori, è stato registrato un trend discontinuo delle categorie di indicatori monitorati che tende a diminuire alla fine del periodo di osservazione in entrambe gli esperimenti, il monitoraggio della conta vitale batterica dovrebbe avvenire per un tempo più lungo rispetto alla sperimentazione eseguita, allo scopo di rivelare il possibile effetto di biorisanamento anche sulla componente batterica degli eterotrofi. Probabilmente, il regolare funzionamento dell'impianto con immissione di acqua giornaliera nelle vasche non consente di rivelare in modo evidente e significativo l'effetto di biorisanamento da parte del sistema testato.

Infine, i biorisanatori utilizzati sono stati in grado di ridurre la carica batterica nell'acqua secondo quanto rivelato dall'esperimento sulla vasca B chiusa, con un'attività di rimozione batterica differenziata (prima le Vibrionaceae e dopo *E. coli* e coliformi). Pertanto, nella progettazione di sistemi IMTA *land-based*, si suggerisce l'utilizzo di una o più vasche di decantazione (contenente la biomassa di biorisanatori) nella quale far confluire l'acqua proveniente dalle vasche di allevamento, per l'abbattimento della carica batterica prima di scaricare il refluo.

3.3.4. Determinazione dei solidi sospesi nell'acqua

La determinazione dei solidi sospesi totali (Total Suspended Matter, TSM) nei campioni di acqua nelle diverse vasche sperimentali è stata effettuata filtrando 500 ml di acqua su filtri Whatman GF/F (\varnothing 47 mm) pre-muffolati per 4 ore a 450°C e poi pesati su bilancia analitica. Dopo la filtrazione del campione il filtro con il particolato è stato lavato 3 volte, con 15 ml di acqua MilliQ. Il filtro quindi è stato congelato a -20°C fino al momento dell'analisi. Successivamente il filtro è stato essiccato in stufa termostatica a 105°C per 48 ore e lasciato raffreddare in essiccatore per 1 ora prima di effettuare la pesata dello stesso. La differenza di peso del filtro tra prima della filtrazione e dopo la filtrazione ha permesso la determinazione della quantità (in mg) di solidi sospesi presenti nel campione; rapportando questa al volume di acqua filtrata (espressa in litri) si ottengono i mg/L di solidi sospesi.

I risultati della determinazione dei solidi sospesi totali (TSM) nelle vasche A, B e C nei due esperimenti, sono riportati in Figura 3.3.J. Nel primo esperimento è stato registrato una diminuzione dei TSM nella vasca A (pesci + biorisanatori) con valori da 0,031±0,006 a 0,021±0,008 mg/L, mentre nella vasca C, con i soli pesci, il valore è aumentato. Anche nel secondo esperimento i valori di TSM sono diminuiti nella vasca A, mentre nella vasca C sono rimasti pressoché costanti Figura 3.3.J.

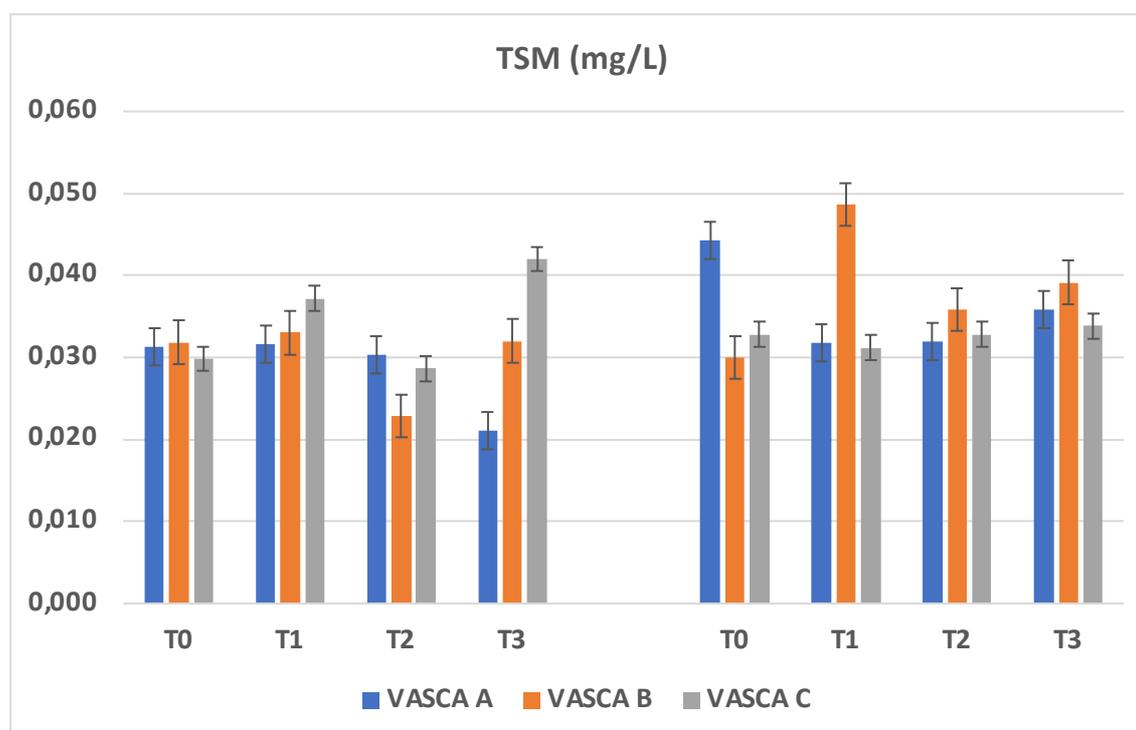


Figura 3.3.J – Determinazione dei solidi sospesi totali (TSM) nell'acqua delle vasche A, B e C nel primo (sinistra) e nel secondo esperimento (destra).

3.4 Valutazione comparativa del benessere dei pesci allevati in un sistema multi-trofico ed in uno tradizionale

Il benessere e la salute di una delle specie molto importanti nell'acquacoltura Mediterranea come l'orata (*Sparus aurata*) quando è allevata in co-coltura con organismi biorisanatori quali la spugna *Hymeniacidon perlevis*, il polichete *Sabella spallanzanii* e la macro-alga *Chaetomorpha linum* è stato valutato nel corso di tre mesi (95 giorni) di esperimento in condizioni standardizzate.

Pesci alimentazione e protocollo sperimentale

Individui di orate sono stati acquisiti da un allevamento commerciale REHOMARE (Gallipoli, Italia) e trasferiti nelle strutture dell'impianto sperimentale dell'Istituto di ricerca COISPA Tecnologia & Ricerca (Bari, Italia). I pesci sono stati mantenuti indisturbati per due settimane in acqua di mare (pH=7,1 ± 0,05, temperatura di 17 ± 1°C, saturazione di ossigeno di ~80% e salinità di 35 PSU) ad una densità di allevamento di < 20 kg/m³ ed una fotoperiodo 12:12 (12h di luce, 12h di buio; luce dalle 6:00 alle 18:00) (Figura 3.4.A).



Figura 3.4.A – Impianto di provenienza delle orate, trasporto e vasca di mantenimento nell'impianto sperimentale.

I pesci sono stati allevati in un sistema a flusso aperto con ricambio d'acqua di 25 L/min e sono stati nutriti con mangimi commerciali (Skretting Marine 3 P, Italia) pari a circa l'1% della loro massa corporea. Dopo un periodo di due settimane, i pesci sono stati etichettati individualmente con pit di identificazione a radiofrequenza ID100 (DORSET ID, Trovan, Olanda) e mantenuti nelle condizioni sopra descritte fino all'inizio dell'esperimento (Figura 3.4.B). Successivamente, i pesci sono stati separati in modo casuale in tre vasche da 1,2 m³ (n = 66-70 per vasca; circa 21 kg/m³) (Figura 3.4.B), mantenendo gli stessi parametri di qualità dell'acqua e fotoperiodo specificati in precedenza (Figura 3.4.C).



Figura 3.4.B – Rappresentazione schematica della sperimentazione.



Figura 3.4.C – Vasche sperimentali presso l'impianto sperimentale COISPA Tecnologia&Ricerca.

Il mangime utilizzato durante la prova è stato Marine 3 P (Skretting, Italia). Due vasche sono state designate come condizioni di allevamento di controllo cioè senza biorisanatori, mentre la terza vasca è stata utilizzata per la condizione di biorisanamento. Nella vasca con i biorisanatori, espunti di spugna (*H. perlevis*), 50 individui di policheti (*S. spallanzanii*) e la macro-alga (*C. linum*), sono state posizionate in apposite supporti e retine e poste alla parete della vasca (Figura 3.4.D). L'esperimento è durato circa tre mesi (95 giorni).



Figura 3.4.D – Vasca sperimentale con biorisanatori: spugne (*H. perlevis*), policheti (*S. spallanzanii*) macro-alga (*C. linum*).

Monitoraggio benessere: mortalità, accrescimento parametrici ematici e plasmatici

La mortalità è stata registrata quotidianamente durante il periodo sperimentale. All'inizio (T0) e alla fine (Tfine) dell'esperimento, i pesci sono stati catturati delicatamente dalle vasche di allevamento e leggermente anestetizzati con una soluzione idroalcolica di olio di chiodi di garofano (15 ppm; Erbofarmosan, Bari, Italia). Sono stati registrati la lunghezza totale (cm) e il peso (g). Sono stati valutati il tasso di crescita specifico (SGR), il rapporto di conversione del mangime (FCR) e il rapporto di efficienza proteica (PER). L'SGR è stato calcolato utilizzando la seguente equazione:

$$\text{SGR} = 100 * (\ln(W_i) - \ln(W_f)) / T$$

dove W è il peso totale del pesce (g) all'inizio dell'esperimento (W_i) e alla fine dell'esperimento (W_f) e T è il numero di giorni di alimentazione.

L'FCR è stato calcolato come il rapporto tra il mangime ingerito (kg di peso secco) e la biomassa di peso acquisito (kg).

Il PER è stato calcolato dividendo l'aumento di peso del pesce per il totale delle proteine ingerite durante l'esperimento.

Alla fine dell'esperimento, un sottocampione di pesci (n=8 per condizione di allevamento) è stato selezionato casualmente per il prelievo di sangue. Prima di procedere alle misurazioni della crescita di tutti i pesci della vasca, il sottocampione di pesce è stato prelevato delicatamente dalle vasche di allevamento e immerso in anestetico (olio di chiodi di garofano, 30 ppm) per 2-3 minuti prima di procedere al prelievo di sangue (Figura 3.4.E). I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena caudale (peduncolo caudale) utilizzando una siringa eparinizzata e sono stati utilizzati per valutare i livelli di diversi parametri ematologici e biochimici legati alla salute e al benessere dei pesci.



Figure 3.4.E – Prelievo di sangue dal peduncolo caudale di orate alla fine della sperimentazione.

Analisi dei parametri ematici e plasmatici

L'ematocrito è stato determinato utilizzando microtubo per ematocrito eparinizzato riempita con sangue intero direttamente dall'ago della siringa. La provetta è stata quindi centrifugata a 15.000 g per 3 minuti e il risultato è stato immediatamente letto. L'ematocrito è stato espresso come percentuale di globuli rossi sull'intero volume del sangue. I livelli di emoglobina sono stati misurati utilizzando un kit commerciale (H7379; Sigma, USA) e a questo scopo 5 μ l di sangue intero sono stati congelati a -20° C. Il sangue rimanente è stato trasferito in una provetta con K3EDTA (VACUMED, Torreglia, Italia) ed è stato centrifugato a 15.000 \times g per 3 minuti per ottenere il plasma, che è stato conservata a -20 °C fino a ulteriori analisi.

I livelli di cortisolo plasmatico sono stati misurati utilizzando un kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) commerciale (Inter-medical®) seguendo le istruzioni del produttore. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio e lattato sono state misurate sulla base della reazione

enzimatica colorimetrica Trinder utilizzando kit commerciali (da Intermedical® per il glucosio e Giese® diagnostic per il lattato) seguendo le istruzioni del produttore. Infine, i livelli sierici totali di immunoglobulina M (IgM) e fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1) sono stati analizzati utilizzando kit ELISA (BT LAB) seguendo le istruzioni del produttore.

Analisi Statistiche

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il software R versione 4.0.4 (R Development Core Team, 2021) con un livello di significatività del 95%. I dati sono presentati come media \pm s.d. (deviazione standard). La crescita è stata valutata utilizzando un Generalized linear mixed model (GLMM) con tempo di campionamento (T0 vs. Tfine), condizioni di allevamento (controllo vs. biorisanamento) e l'interazione tra i due fattori come effetti fissi, mentre l'identità del pesce è stata inclusa come valore casuale effetto. Infatti, avendo etichettato tutti i pesci coinvolti nell'esperimento le performance di crescita erano calcolati con il singolo pesce come unità statistica. Il GLMM è stato seguito da test post-hoc (medie marginali stimate) aggiustati con il metodo Bonferroni per testare le differenze tra i gruppi. Inoltre, SGR, FCR e PER sono stati confrontati tra i due gruppi testati (controllo e biorisanamento) utilizzando i test t di Student. Per l'analisi dei parametri ematologici e biochimici sono stati applicati i test Wilcoxon per confrontare ciascun parametro tra le due condizioni di allevamento (controllo vs. biorisanamento).

Risultati sulle performance di crescita

Nel complesso, i pesci hanno mostrato una crescita nel tempo ($F=399,9$, $p<0,001$) e le condizioni di allevamento non hanno influenzato significativamente la crescita ($F=0,3$, $p=0,6$). È stata osservata un'interazione significativa tra tempo e dieta ($F = 41,69$, $p <0,001$), ma l'analisi post-hoc non ha rivelato differenze significative tra le due condizioni all'interno di ciascun tempo di campionamento ($p>0,05$; Figura 3.4.F). Più in dettaglio, le orate allevate in condizioni di controllo e di biorisanamento sono cresciute rispettivamente da $367,9 \pm 71,8$ g a $461,5 \pm 91,5 \pm 86,4$ g e da $398,0 \pm 77,3$ g a $445,9 \pm 88,9 \pm 89,0$ g.

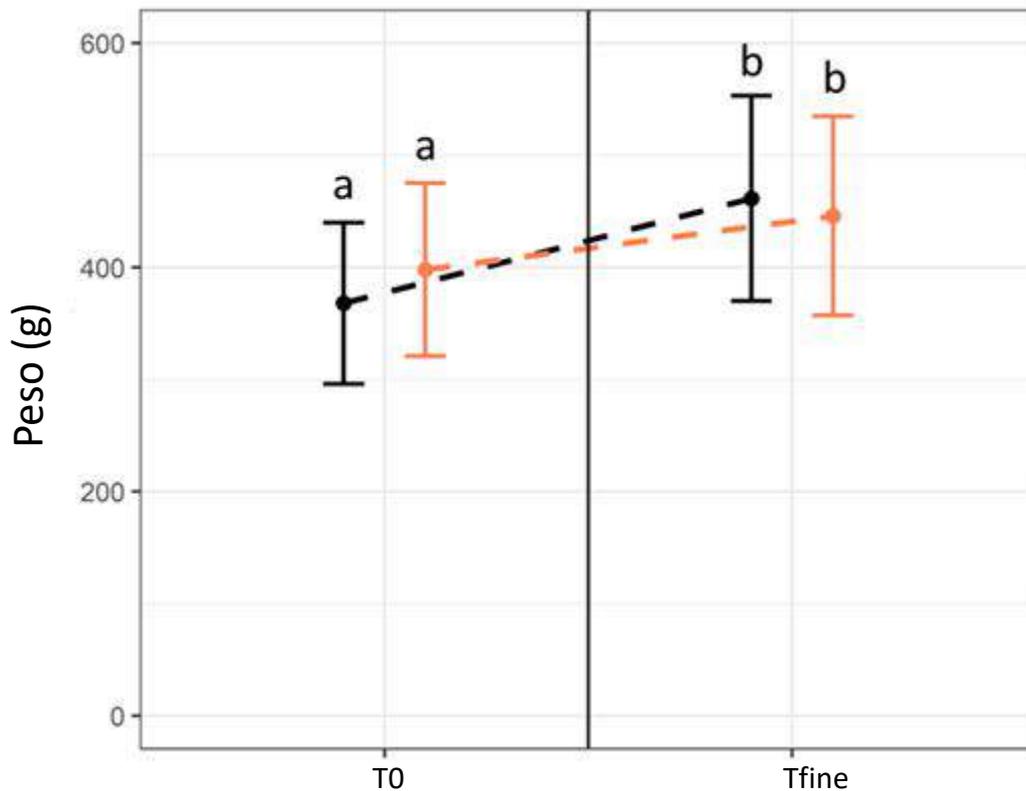


Figure 3.4.F – Peso (g; Media \pm s.d.) misurato all’inizio e alla fine del periodo sperimentale (T0 e Tfine) nell’orata (*Sparus aurata*) nella condizione di controllo (nero; n = 129) e nella condizione di biorisanamento (arancione; n = 45). Lettere diverse indicano una differenza statistica significativa tra i gruppi ($p < 0,05$, GLMM seguito dal Tukey HSD post-hoc test)

L’SGR e il PER erano inferiori nell’orata allevata nella condizione di biorisanamento (Vasca A) rispetto alla condizione di controllo ($t = -7,55$, $p < 0,001$ e $t = -9,69$, $p < 0,001$, rispettivamente) (Vasche C), ma l’FCR era simile tra le due condizioni di allevamento ($W = 1,25$, $p = 0,22$; Figura 3.4.G). Nel corso della durata dell’esperimento, si è verificato un tasso di mortalità del 4,3% nelle orate allevate nella condizione di controllo, mentre la mortalità nelle orate allevate nella condizione di biorisanamento era del 28%.

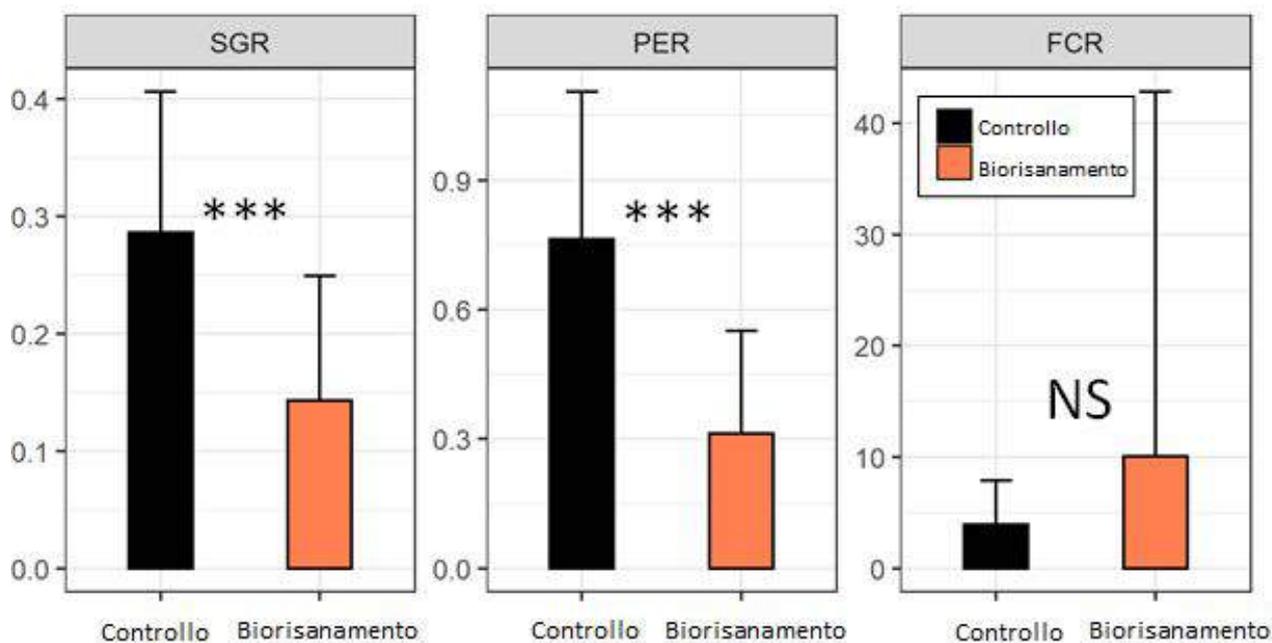


Figure 3.4.G – Tasso di crescita specifico (SGR), rapporto di efficienza proteica (PER) e tasso di conversione del mangime (FCR) (g; media \pm s.d.) calcolati nel periodo sperimentale per le orate nelle condizioni di controllo (in nero; n = 129) e nella condizioni di biorisanamento (in arancione; n = 45). Differenze statistiche significative tra i trattamenti sono indicate da *** ($p < 0,001$; test di Wilcoxon). NS indica l'assenza di differenza tra i trattamenti ($p > 0,05$).

Parametri ematici e fisiologici

I livelli di cortisolo erano significativamente più bassi nel plasma dei pesci allevati nelle condizioni di biorisanamento rispetto ai pesci allevati nella condizione di controllo ($W = 13$, $p < 0,05$), mentre i livelli plasmatici di lattato e glucosio non mostravano differenze significative tra i pesci nelle due condizioni sperimentali ($W = 44$, $p = 0,23$ e $W = 20$, $p = 0,23$, rispettivamente; Figura 8). I livelli di emoglobina erano simili tra i pesci delle due condizioni ($W = 13$, valore $p = 0,09$), ma l'ematocrito era significativamente inferiore nel plasma dei pesci allevati nella condizione di biorisanamento rispetto ai pesci allevati nella condizione di controllo ($W = 3$, $p < 0,01$; Figura 8). Per quanto riguarda i parametri dell'immunità il livello delle proteine totali non differiva significativamente tra le due condizioni di allevamento ($W = 18$, $p = 0,16$), mentre l'immunoglobulina M era significativamente inferiore nella condizione di biorisanamento rispetto al controllo ($W = 0$, $p < 0,001$). Infine, il livello di IGF-1 era più alto nel plasma dei pesci allevati nella condizione di biorisanamento rispetto ai pesci allevati nel controllo ($W = 51$, $p < 0,05$; Figura 3.4.H).

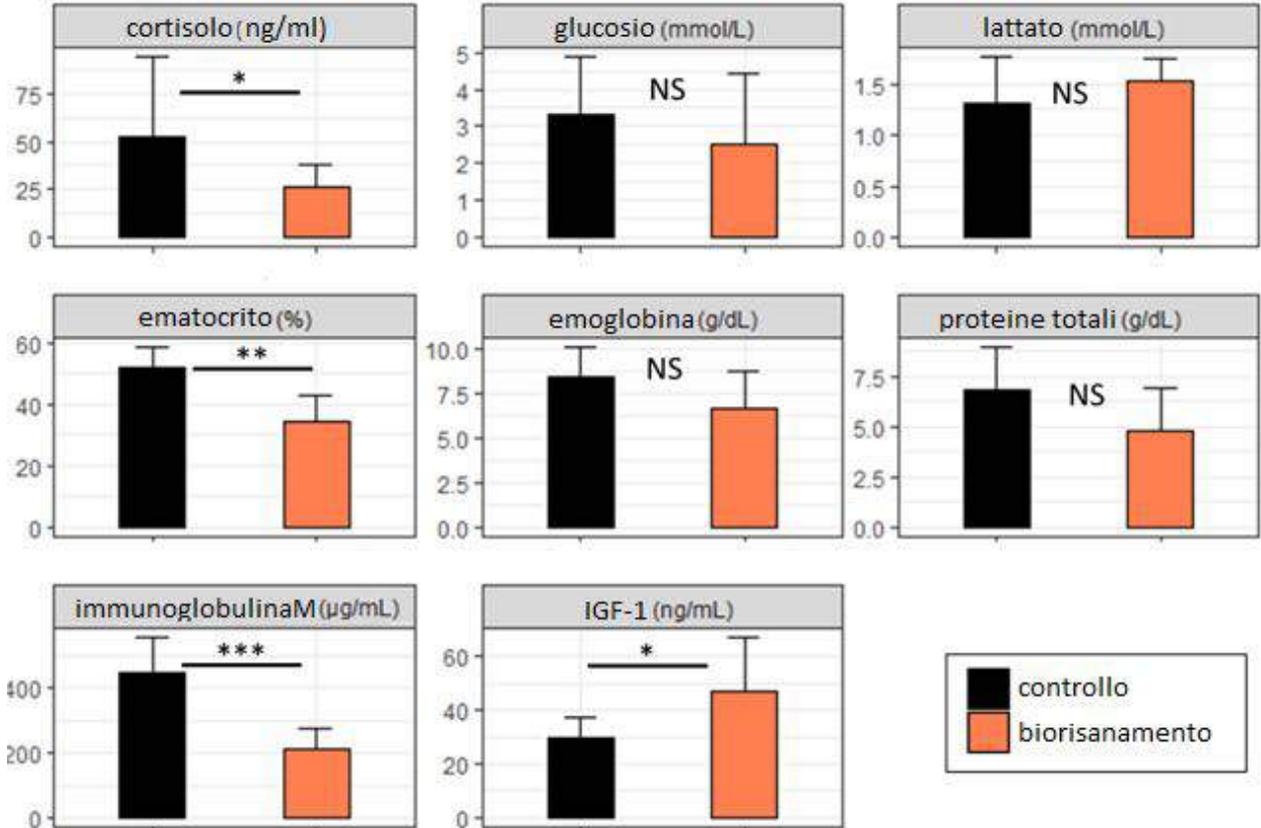


Figure 3.4.H - Parametri fisiologici ed ematici per la valutazione dello stress e benessere (media \pm s.d.) misurati alla fine del periodo di esperimento nell'orata nella condizione di controllo (nera; n = 8 pesci) e nella condizione di biorisanamento (arancione; n = 8 pesci). Per ciascun parametro sono indicati i risultati delle differenze statistiche (NS: $p > 0,05$; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; test di Wilcoxon).

Discussione

In questo studio, abbiamo valutato gli effetti sulla salute e sul benessere delle orate dell'inclusione di spugne (*H. perlevis*), di policheti (*S. spallanzanii*) e di la macroalga (*C. linum*) per il biorisanamento nelle vasche di allevamento in un sistema integrato IMTA. Nel complesso, abbiamo osservato che la crescita del pesce non è stata influenzata in modo significativo dall'inclusione dei biorisanatori. Sebbene i pesci nella vasca IMTA (Vasca A, con biorisanatori) abbiano mostrato un tasso di crescita specifico inferiore e un rapporto di efficienza proteica inferiore, non è stata osservata alcuna differenza nel peso finale. Ciò suggerisce che l'inclusione di specie IMTA non ha avuto un forte impatto negativo sulle prestazioni di crescita, ma questo aspetto dovrebbe essere ulteriormente studiato in esperimenti a più lungo termine.

Per quanto riguarda gli indicatori fisiologici dello stress, i livelli plasmatici di glucosio e lattato sono risultati simili tra i pesci allevati nelle due condizioni, che indicano l'assenza di un impatto significativo sul metabolismo aerobico ed anaerobico, mentre il livello basale di cortisolo plasmatico è risultato inferiore nei pesci allevati nella condizione di biorisanamento rispetto a quelli allevati in condizioni di controllo. Un

aumento del livello di cortisolo è generalmente noto come risposta adattativa di un organismo per far fronte a un fattore di stress (Schreck & Tort, 2016). In questo caso, livelli più bassi di cortisolo potrebbero indicare che i pesci del gruppo di controllo erano più stressati rispetto ai pesci rispetto alla condizione di biorisanamento. Potenzialmente questo risultato potrebbe essere dovuto al ruolo di biorisanamento delle specie IMTA e alla conseguente diminuzione della carica batterica e sostanze organica nell'ambiente di allevamento. Tuttavia, va notato che i livelli plasmatici di cortisolo misurato nell'orata, sia nella condizione di controllo che nelle condizione di biorisanamento, sembrano essere nel range considerato "basale" per questa specie (Ganga et al., 2011; Ellis et al., 2012; Samaras et al., 2018; Alfonso et al., 2023; Carbonara et al., 2019). Il range di cortisolo basale è molto ampio per l'orata così come per altre specie ittiche allevate e varia da <10 a 50 ng/ml (Ganga et al., 2011; Ellis et al., 2012). Il cortisolo tende ad aumentare rapidamente attraverso l'asse HPI (Ipotalamo-Pituitario-Interrenale) subito dopo uno stimolo stressorio (Mommsen et al., 1999), con diversi effetti sia fisiologici (per esempio metabolismo aerobico e anaerobico), comportamentali ed immunitari. Inoltre, l'aumento dei livelli plasmatici di cortisolo sembra sopprimere l'appetito, agendo attraverso il metabolismo del glucosio plasmatico (Heath 1995). Possono quindi manifestarsi effetti come ridotta assunzione di cibo, efficienza di conversione degli alimenti e crescita in risposta a livelli elevati di cortisolo (De Boeck et al. 2001; Gregory & Wood 1999). Quindi, livelli elevati cronici di cortisolo, possono portare a condizioni di disagio e potenzialmente a effetti deleteri sulle funzioni biologiche, comprese le caratteristiche immunitarie, la riproduzione, la crescita e, in ultima analisi, la sopravvivenza (Schreck et al., 2001; Sadoul & Vijayan, 2016; Schreck & Tort, 2016; Yada & Tort, 2016). Sono quindi necessari ulteriori studi per spiegare e interpretare correttamente queste differenze di cortisolo e se le variazioni riscontrate rientrano nelle variazioni fisiologiche a livello individuale e/o di popolazione per questa specie (Ellis et al., 2012).

Oltre a livelli più bassi di cortisolo, sono state osservate altre differenze significative tra le condizioni, tra cui un ematocrito e una concentrazione plasmatica di IgM più bassa nei pesci del gruppo di biorisanamento. Da un lato, l'ematocrito indica il volume dei globuli rossi nel plasma, essendo i globuli rossi responsabili della fornitura di ossigeno ai tessuti. Un ematocrito inferiore può essere correlato a vari fattori di stress, con conseguenti effetti dannosi sulla salute e sulle prestazioni produttive (Esmaeili, 2021), ma ciò non è stato confermato dall'emoglobina che non era statisticamente diversa tra le condizioni. Inoltre, non è stata osservata alcuna differenza tra le condizioni anche nelle proteine totali, suggerendo che non vi sia alcun impatto negativo derivante dall'inclusione delle specie IMTA nella vasca di allevamento. Le proteine totali possono essere considerate una misura della quantità di immunoglobuline (immunità specifica) (Carbonara et al., 2021). D'altra parte, è noto che il cortisolo agisce anche come mediatore nella risposta immunitaria (Yada & Tort, 2016; Mommsen et al., 1999) e in questo studio abbiamo valutato l'immunoglobulina M come fattore della immunità aspecifica. Le immunoglobuline sono una componente importante del sistema immunitario umorale dei vertebrati e le IgM sono note come principale immunoglobulina nei teleostei e uno dei fattori dell'immunità aspecifica (Wilson et al., 1995; Ellis, 1998; Cuesta et al., 2004). In questo studio, i livelli di immunoglobulina

Ma erano più bassi nei pesci provenienti dalla condizione di biorisanamento, suggerendo che i pesci potrebbero essere più vulnerabili a infezioni, ma sono necessari ulteriori studi per confermare questa ipotesi oppure considerare queste variazioni a livello individuale e di popolazione del tutto fisiologiche. Per quanto riguarda l'ultimo parametro fisiologico indagato, l'IGF-1, è noto che il cortisolo ne inibisce la produzione (Sadoul & Vijayan, 2016). Ciò è coerente con i risultati del nostro studio in cui bassi livelli di cortisolo sono collegati a un alto livello di IGF-1 nel plasma dei pesci allevati in condizioni di biorisanamento. Tuttavia, il livello più elevato di IGF-1 non è stato collegato a una migliore crescita. I livelli di IGF-1, del resto non sono controllati solo dal livello di cortisolo, ma da un ampio spettro di fattori quali ad esempio la qualità della dieta, la quantità di cibo, il fotoperiodo, la temperatura, il sesso e la riproduzione (Canosa & Bertucci, 2020; 2023).

Infine, è stata registrata una mortalità più elevata nella vasca con la condizione di biorisanamento (28% contro 4,3% nella condizione di controllo), ma questo risultato è limitato dall'utilizzo di un'unica vasca per la condizione di biorisanamento. Ciò dovrebbe quindi essere ulteriormente studiato per assicurarsi che altri fattori non siano stati la causa di questo tasso di mortalità più elevato. Infatti, la presenza dei supporti per le specie IMTA (Figura 4), potrebbero aver aumentato fenomeni competitivi e/o conflittuali tra gli esemplari di orata (Carbonara et al. 2019; Dara et al., 2023). Un'altra ipotesi che potrebbe spiegare una più alta mortalità potrebbe essere l'influenza di una maggiore manipolazione ed interazione nella vasca con biorisanamento dovuta alla gestione delle strutture di supporto delle spugne, policheti e macroalghe (Mhalhel et al., 2023).

In conclusione, i nostri risultati indicano l'assenza di un'impatto negativo nell'uso di specie come spugne (*H. perlevis*), policheti (*S. spallanzanii*) e la macro-alga (*C. linum*) per il biorisanamento sulla crescita e sul benessere di *Sparus aurata*, sebbene siano state osservate alcune differenze tra le condizioni in alcuni parametri fisiologici e nella mortalità. Questi risultati preliminari evidenziano la necessità di ulteriori studi per districare le cause che sono alla base di alcune variazioni fisiologiche e per valutare ulteriormente i potenziali benefici dell'utilizzo di IMTA per il biorisanamento nei sistemi di acquacoltura. Inoltre, questi risultati valutati insieme alla quantificazione della carica batterica e dei nutrienti possono essere una base conoscitiva per poter attenuare gli impatti indesiderati sull'ambiente di allevamenti intensivi e/o semi-intensivi e di quelli *land-based*.

CAPITOLO 4

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

La sperimentazione condotta sul mantenimento in acquario di due demosponge (*Axinella cannabina* e *Aplysina aerophoba*) ha previsto il monitoraggio dello stato di salute, del tasso di accrescimento e di sopravvivenza e delle concentrazioni dei nutrienti (nitriti, nitrati e fosfati) nell'acqua dei mesocosmi. Gli espianti di spugna sono stati alimentati con tre microalghe liofilizzate di dimensioni e composizione nutrizionale variabili: *Isocrysis aff. galbana* (diametro 4-8 μm), *Nannocloropsis* sp. (diametro 2-4 μm) e *Thalassiosira weissflogii* (diametro 10-50 μm). Un quarto regime alimentare consisteva in una miscela delle tre microalghe in rapporto 1:1:1. Nel complesso, al termine del periodo di osservazione, la sopravvivenza per *A. aerophoba* e *A. cannabina* è stata rispettivamente del 58,33% e del 94,44%. Per quanto riguarda il monitoraggio del peso degli espianti, è stato osservato che alla fine dell'esperimento il peso umido medio delle due specie è risultato pari all'88 \pm 1% per *A. aerophoba* e al 108 \pm 1% per *A. cannabina*, rispetto ai pesi iniziali. Inoltre, una ulteriore sperimentazione di tre mesi condotta con espianti di diverse specie di demosponge (*A. aerophoba*, *Geodia cydonium*, *Sarcotragus spinosulus* e *Hymeniacidon perlevis*) ha evidenziato che le migliori prestazioni sono state ottenute con *H. perlevis* che ha mostrato un incremento mensile della superficie di circa il 16%.

Gli esperimenti condotti in laboratorio con la macroalga *Chaetomorpha linum* hanno dimostrato che una biomassa algale, con densità di 10 mg/L, è capace di sottrarre dall'acqua più della metà dei sali di azoto e fosforo aggiunti in soluzione (10 mg/L di ammonio e di nitrati, 5 mg/L di fosfati) dopo 24 ore, e di rimuoverli completamente dopo 96 ore.

Le analisi condotte in laboratorio con la spugna *S. spinosulus* hanno permesso di descrivere la sua efficienza di filtrazione nei confronti del batterio patogeno *Vibrio parahaemolyticus*. In particolare, sono state testate due concentrazioni batteriche, 10⁴ e 10⁶ CFU/mL. I risultati ottenuti durante gli esperimenti di laboratorio, hanno dimostrato che una biomassa di 41,6 mL/L (15 g_{DW}/L) di *S. spinosulus* può controllare efficacemente la crescita del batterio *V. parahaemolyticus* ad entrambe le concentrazioni, mostrando un'efficienza di ritenzione batterica prossima al 100% e una *Clearance rate* massima di 45,0 mL/(g_{DW}*h).

Sulla base dei risultati ottenuti da questa prima fase, è stato realizzato, in laboratorio, un modello di collevamento multi-trofico costituito da tre componenti: pesci (*Dicentrarchus labrax*), spugne (*S. spinosulus*) e alghe (*C. linum*). Questo sistema è stato realizzato in vasche contenenti 15 L di acqua marina filtrata ciascuno e per un periodo complessivo di cinque giorni in cui sono stati misurate giornalmente le concentrazioni dei nutrienti e della carica batterica. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'efficienza del sistema multi-trofico realizzato. I valori delle concentrazioni dei nutrienti nelle vasche con i biorisanatori sono risultati costanti per tutto il periodo di osservazione e sempre inferiori a 1 mg/L, diversamente da quanto registrato per le vasche contenenti le sole spigole in cui i fosfati e l'ammonio hanno raggiunto rispettivamente valori finali di 2,02 \pm 0,39 mg/L e 11,3 \pm 1,2 mg/L. Anche le analisi microbiologiche hanno mostrato valori inferiori (fino a tre

ordini di grandezza) dei parametri microbiologici misurati nelle vasche con i biorisanatori rispetto alle vasche controllo (senza biorisanatori).

Infine, a conclusione della prima fase di laboratorio, è stata condotta un'indagine attraverso la diffusione di un questionario in tutta Italia, con l'obiettivo di valutare l'interesse degli acquariofili nei confronti dei poriferi e la loro disponibilità ad acquistarli come specie ornamentali (*Citizen Science approach*). Sono state raccolte complessivamente 101 interviste di partecipanti distribuiti in quasi tutte le regioni italiane, prevalentemente al nord (Lombardia, Liguria, Veneto ed Emilia-Romagna) e al sud (Puglia), di età media di 38 anni. Quasi il 90% dei partecipanti ha dichiarato di avere conoscenze sui poriferi e sulla capacità di filtrazione, mentre solo il 22% dichiara di conoscere i sistemi IMTA e il loro funzionamento, indipendentemente dal loro livello di istruzione. Gli intervistati alla domanda sull'ipotetica intenzione di acquisto di spugne allevate in sistemi di produzione sostenibili, solo il 17% del totale non ha mostrato interesse, mentre 2 intervistati su 3 hanno manifestato interesse ad acquistarle. Questa prima indagine apre nuove prospettive di valorizzazione di questi invertebrati nel settore dell'acquariologia che favorirebbe la diffusione di pratiche di allevamento sostenibili e ridurrebbe la pressione di raccolta sulle popolazioni naturali.

La sperimentazione del prototipo del sistema di biorisanamento in campo condotta presso la sede della COISPA Tecnologia & Ricerca ha previsto l'allestimento di diverse vasche: una con orate (*Sparus aurata*) e biorisanatori (poriferi: *Hymeniacidon perlevis*, policheti: *Sabella spallanzanii* e macroalghe: *Chaetomorpha linum*), una vasca controllo contenente solo orate (in duplicato) ed una terza vasca contenente solo i biorisanatori che veniva "alimentata" con l'acqua proveniente dalla vasca controllo. Dal monitoraggio degli organismi biorisanatori, dei pesci e dei parametri (macronutrienti e carica batterica) nell'acqua di allevamento è emerso che: il volume degli espianti di poriferi nella vasca con orate e biorisanatori, dopo una prima fase di acclimatazione che ha fatto registrare un lieve decremento, ha indicato un incremento del 5% circa. Per quanto riguarda i policheti, una volta posizionati in adeguati supporti che ne hanno impedito la predazione da parte delle orate non sono state registrate ulteriori criticità. Infine, dalle analisi sul contenuto di macronutrienti (fosfati, nitrati, nitriti e ammonio) nell'acqua, sebbene siano emersi valori di concentrazione troppo bassi per poter apprezzare differenze significative tra i campioni di acqua provenienti dalle diverse vasche (probabilmente a causa della sensibilità dei metodi utilizzati non sufficientemente elevata), nell'alga delle vasche (con e senza pesci) per tutti i macronutrienti analizzati, ad eccezione dei nitrati, è stato registrato un aumento significativo rispetto ad un elemento di riferimento, il controllo, costituito da alghe campionate in ambienti naturali, ad indicare una buona capacità di assorbire tali nutrienti, riducendone quindi il contenuto nelle acque. L'elevato tasso di attività metabolica registrato nelle alghe delle vasche (con e senza pesci) è stato confermato mediante analisi dei livelli di perossidazione lipidica, superiori nelle due vasche rispetto al controllo.

Le analisi batteriologiche condotte sull'acqua delle vasche della COISPA Tecnologia & Ricerca hanno permesso di concludere che, sebbene nella vasca con pesci ed organismi biorisanatori è stato registrato un trend discontinuo per gli indicatori monitorati (Vibrionacee, *Escherichia coli* e coliformi, Enterococchi), la

loro concentrazione tende a diminuire alla fine del periodo di osservazione. Inoltre, il monitoraggio della conta vitale batterica dovrebbe avvenire per un tempo più lungo rispetto alla sperimentazione eseguita, allo scopo di rivelare il possibile effetto di biorisanamento anche sulla componente batterica degli eterotrofi. Probabilmente, il regolare funzionamento dell'impianto con immissione di acqua giornaliera nelle vasche non consente di rivelare in modo evidente e significativo l'effetto di biorisanamento da parte del sistema testato. Infine, è stata osservata un'attività di rimozione batterica differenziata: prima le Vibrionaceae e dopo *E. coli* e coliformi.

L'allevamento delle orate con diverse condizioni (con e senza biorisanatori) aveva lo scopo di verificare gli effetti sulle condizioni dei pesci della presenza dei biorisanatori in vasca di allevamento (sistema IMTA). Nella sperimentazione sono state monitorate sia le *performance* di crescita che parametri fisiologici plasmatici ed ematici (cortisolo, glucosio, lattato, emoglobina, ematocrito, ormone della crescita) che parametri immunologici (proteine totali e Immunoglobulina M IgM). La sperimentazione è durata circa tre mesi (95 giorni) in condizioni controllate e costanti (fotoperiodo, ossigeno, pH e salinità). L'accrescimento ha mostrato essere non significativamente diverso sia dal punto di vista del peso totale che dal punto di vista del rapporto di conversione del mangime (Feed Condition Ratio). Inoltre i parametri fisiologici e immunologici come il glucosio, lattato, emoglobina e proteine totali non mostravano differenze significative. L'ormone dello stress (cortisolo) mostrava nel gruppo con IMTA una minore concentrazione così come IgM ed ematocrito, mentre il livello di ormone della crescita era significativamente più alto. Un altro dato tenuto in considerazione è la mortalità che è risultata più alta nel gruppo con IMTA. In generale lo stato fisiologico tra i pesci nei due gruppi sperimentali non è risultato differente, quindi l'introduzione di organismi biorisanatori anche direttamente nelle vasche di allevamento non provoca alterazioni in questo senso. Inoltre, è interessante sottolineare come non ci siano ripercussioni sull'accrescimento e quindi da un punto di vista produttivo. Le differenze riscontrate rientrano nelle variazioni a livello sia individuale che di popolazioni riportate per questa specie in letteratura. Ulteriori approfondimenti dovranno essere, comunque, implementati per poter definire un protocollo standardizzato utilizzabile a livello produttivo in maniera da evitare effetti negativi come quello riguardante la mortalità.

L'acquacoltura si è dimostrata essere l'industria di produzione alimentare in più rapida crescita, e a causa del sovrasfruttamento delle risorse ittiche, ci si aspetta che l'acquacoltura possa soddisfare la crescente domanda globale di prodotti ittici. Tuttavia, con l'intensificarsi della produzione, sono sorte anche le necessità di sviluppare strategie più responsabili per mitigare i diversi impatti ambientali attualmente associati a queste pratiche. È indispensabile, pertanto, promuovere la produzione di specie ad elevato valore commerciale in sistemi "multi-trofici", che hanno dimostrato di ridurre sostanzialmente gli impatti negativi rispetto alle monoculture. Inoltre, è di importanza fondamentale sperimentare nuovi scenari come i modelli LTA e IMTA che pur essendo altamente complessi permettono di diversificare le produzioni e generare *by-product* commercialmente valorizzabile.

L'attività sperimentale condotta in campo ha evidenziato che è necessario concentrarsi sull'ottimizzazione delle combinazioni di specie. Inoltre, è utile sviluppare modelli LTA e IMTA che possano essere trasferibili ad altri sistemi pur riproponendo le combinazioni di specie nel medesimo livello trofico (Figura 4.A).

In conclusione, per una espansione dell'acquacoltura sostenibile, la sperimentazione di modelli di co-coltura anche in sistemi *land-based* dovrebbe essere continuamente aggiornata e ottimizzata, tenendo conto anche del potenziale impatto ambientale e delle potenzialità che le strategie di biorisanamento offrono.

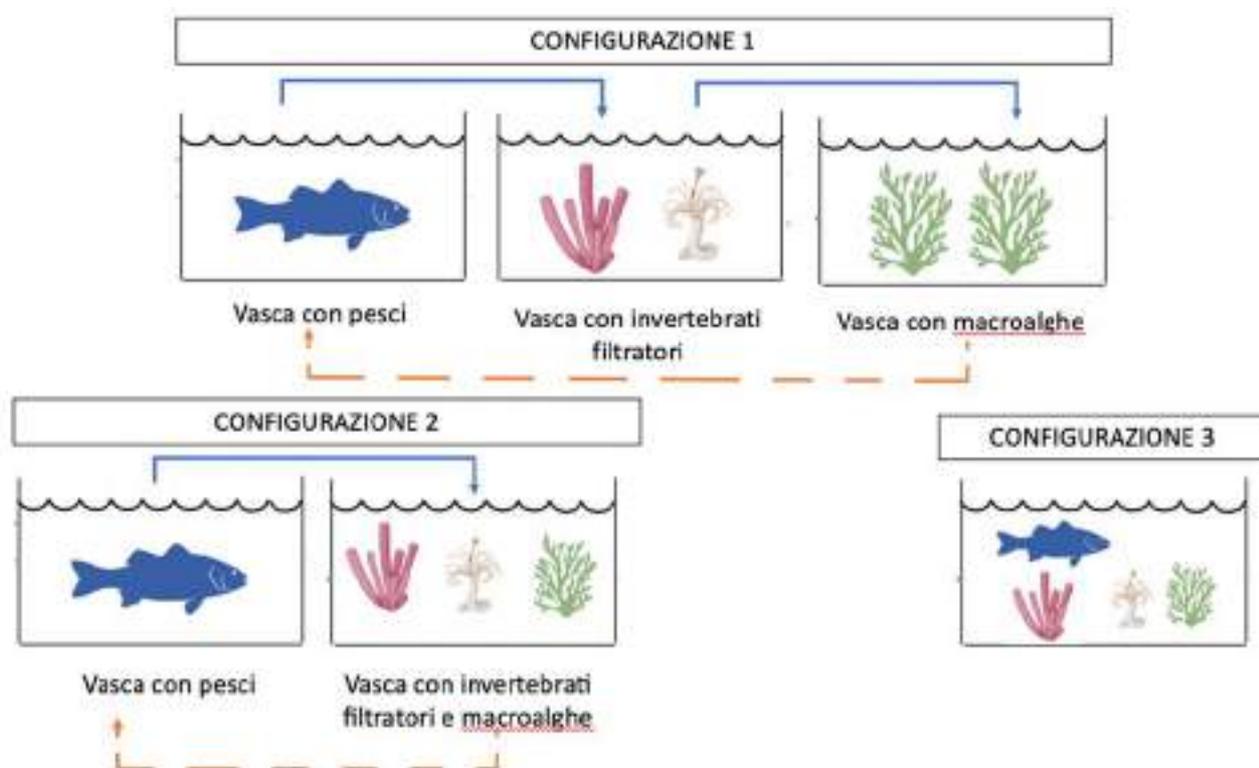


Figura 4.A – Configurazioni teoriche di sistemi di acquacoltura multi-trofica integrata *land-based*, con o senza ricircolo dell'acqua, composta da tre livelli trofici.

CAPITOLO 5

BIBLIOGRAFIA

- Abellan, E., de Murcia, C. O., & Basurco, B. (1999). Marine finfish species diversification: current situation and prospects in Mediterranean aquaculture (No. 24).
- Abreu, M. H., Pereira, R., Yarish, C., Buschmann, A. H., & Sousa-Pinto, I. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, 312(1), 77–87.
- Aguilo-Arce, J., Ferriol, P., Trani, R., Puthod, P., Pierri, C., & Longo, C. (2023). Sponges as Emerging By-Product of Integrated Multitrophic Aquaculture (IMTA). *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(1), 80.
- Ahmed, N., & Glaser, M. (2016). Coastal aquaculture, mangrove deforestation and blue carbon emissions: is REDD+ a solution?. *Marine Policy*, 66, 58-66.
- Ajjabi, L. C., & Chouba, L. (2009). Biosorption of Cu²⁺ and Zn²⁺ from aqueous solutions by dried marine green macroalga *Chaetomorpha linum*. *Journal of Environmental Management*, 90(11), 3485–3489.
- Alabiso, G., Ricci, P., Belmonte, M., Petrocelli, A., & Cecere, E. (2009). Ammonium uptake by *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) (Stackhouse) Steentoft, Irvine and Farnham, from the Mar Piccolo of Taranto. *Biologia Marina Mediterranea*, 16(1), 246–247.
- Alfonso, S., Houdelet, C., Bessa, E., Geffroy, B., & Sadoul, B. (2023). Water Temperature Explains Part of the Variation in Basal Plasma Cortisol Level, within and between Fish Species. *Journal of Fish Biology*, 103, 828–838.
- Almeida, A., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., Alves, E., Costa, L., & Faustino, M. A. F. (2009). Phage therapy and photodynamic therapy: Low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. In *Marine Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md7030268>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46.
- Anderson, M. J., Gorley, R. N., & Clarke, K. R. (2008). PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. In Plymouth, UK.
- Aquilino, F., Paradiso, A., Trani, R., Longo, C., Pierri, C., Corriero, G., & de Pinto, M. C. (2020). *Chaetomorpha linum* in the bioremediation of aquaculture wastewater: Optimization of nutrient removal efficiency at the laboratory scale. *Aquaculture*, 523, 735133.
- Arduini, D., Calabrese, C., Borghese, J., De Domenico, S., Putignano, M., Toso, A., Gravili, C., & Giangrande, A. (2023). Perspectives for exploitation of *Sabella spallanzanii*'s biomass as a new Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) by-product: feeding trial on *Amphiprion ocellaris* using sabella meal. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11(1), 123.
- Aresta, A., Marzano, C. N., Lopane, C., Corriero, G., Longo, C., Zambonin, C., & Stabili, L. (2015). Analytical investigations on the lindane bioremediation capability of the demosponge *Hymeniacidon perlevis*. *Marine Pollution Bulletin*, 90(1-2), 143-149.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish, sixth edition. In *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, Sixth Edition*.
- Barrington, K., Chopin, T., & Robinson, S. (2009). Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine

temperate waters. Integrated Mariculture - A Global Review - FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper NO. 529.

- Bartoli, M., Naldi, M., Nizzoli, D., Roubaix, V., & Viaroli, P. (2003). Influence of clam farming on macroalgal growth: a microcosm experiment. *Chemistry and Ecology*, 19(2-3), 147-160.
- Bartoli, M., Nizzoli, D., Naldi, M., Vezzulli, L., Porrello, S., Lenzi, M., & Viaroli, P. (2005). Inorganic nitrogen control in wastewater treatment ponds from a fish farm (Orbetello, Italy): Denitrification versus *Ulva* uptake. *Marine Pollution Bulletin*.
- Bavestrello, G., Corriero, G., & Sarà, M. (1992). Differences between two sympatric species of *Tethya* (Porifera, Demospongiae) concerning the growth and final form of their megasters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 104(1), 81-87.
- Becerro, M. A., Uriz, M. J., & Turon, X. (1994). Trends in space occupation by the encrusting sponge *Crambe crambe*: variation in shape as a function of size and environment. *Marine Biology*, 121, 301-307.
- Bell, J. J., Mcgrath, E., Biggerstaff, A., Bates, T., Cárdenas, C. A., & Bennett, H. (2015). Global conservation status of sponges. In *Conservation Biology*.
- Ben Kahla-Nakbi, A., Haouas, N., El Ouaer, A., Guerbej, H., Mustapha, K. Ben, & Babba, H. (2010). Screening of antileishmanial activity from marine sponge extracts collected off the Tunisian coast. *Parasitology Research*.
- Bolton, J. J., Robertson-Andersson, D. V., Shuuluka, D., & Kandjengo, L. (2009). Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 575-583.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M. (2005). Disease and Health Management in Asian Aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132, 249-272.
- Bostock, J., Mcandrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., & Gatward, I. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2897-2912
- Buschmann, A H, Hernández-González, M. C., Flores, R., Gutiérrez, A., Varela, D., & Huovinen, P. (2010). Massive kelp production in Chile: future prospects, challenges and limitations. XXth International Seaweed Symposium Book of Abstracts, 51.
- Buschmann, Alejandro H, Correa, J. A., Westermeier, R., del Carmen Hernandez-Gonzalez, M., & Norambuena, R. (2001). Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture*, 194(3-4), 203-220.
- Calado, R. (2006). Marine ornamental species from European waters: a valuable overlooked resource or a future threat for the conservation of marine ecosystems? *Scientia Marina*, 70(3), 389-398. <https://doi.org/10.3989/scimar.2006.70n3389>
- Canosa, L.F. & Bertucci J.I. (2023) The effect of environmental stressors on growth in fish and its endocrine control. *Frontiers in Endocrinology* 14:1109461
- Canosa, L.F. & Bertucci, J.I. (2020) Nutrient regulation of somatic growth in teleost fish The interaction between somatic growth, feeding and metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology* 518:111029.
- Carbonara, P., Alfonso, S., Zupa, W., Manfrin, A., Fiocchi, E., Pretto, T., Spedicato, M.T., Lembo, G. (2019) Behavioral and physiological responses to stocking density in sea bream (*Sparus aurata*): Do coping styles matter? *Physiology & Behaviour*, 212, 112698.

- Carvalho AP, Meireles LA, M. F. (1998). Rapid spectrophotometric determination of nitrates and nitrites in marine aqueous culture media. *Analysis*, 26, 347–351.
- Cavallo, R. A., & Stabili, L. (2004). Culturable *Vibrios* biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian Coasts). *Scientia Marina*, 68, 23–29.
- Chopin, T. (2011). Progression of the integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) concept and upscaling of IMTA systems towards commercialization. *Aquaculture Europe*, 36(4), 5-12.
- Chopin, T. (2013). Integrated multi-trophic aquaculture—ancient, adaptable concept focuses on ecological integration. *Global Aquaculture Advocate*, 16(2), 16–19.
- Chopin, T. (2020). Reducing the carbon footprint of ocean-derived food production (fisheries and aquaculture) and shifting diets: Another of the five opportunities to make the ocean part of the solution to climate change. *Aquaculture*, 23, 12–13.
- Chopin, T., Cooper, J. A., Reid, G., Cross, S., & Moore, C. (2012). Open-water integrated multi-trophic aquaculture: environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 4(4), 209-220.
- Chopin, T., Robinson, S. M. C., Troell, M., Neori, A., Buschmann, A. H., & Fang, J. (2008). Multitrophic Integration for Sustainable Marine Aquaculture (S. E. Jørgensen & B. D. B. T.-E. of E. Fath (eds.); pp. 2463–2475). Academic Press.
- Clapin, G., & Evans, D. R. (1995). The status of the introduced marine fan worm *Sabella spallanzanii* in WA. CSIRO Technical Report 2, Division Fish, CSIRO.
- Clapin, Geordie. (1996). The Filtration Rate, Oxygen Consumption and Biomass of the Introduced Polychaete *Sabella Spallanzanii* Gmelin Within Cockburn Sound: Can it Control Phytoplankton Levels and is it an Efficient Filter Feeder?
- Claudet, J. & Frascchetti, S. (2010). Human-driven impacts on marine habitats: A regional meta-analysis in the Mediterranean Sea. *Biological Conservation*, 143: 2195-2206
- Clement, J. A., Yoder, B. J., & Kingston, D. G. (2004). Natural products as a source of CNS-active agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 1(2), 183-208.
- Corriero, G. (1990). Distribuzione ed ecologia dei Poriferi in ambienti ‘confinati mediterranei. University of Genova, Italy.
- Corriero, G., Gherardi, M., Giangrande, A., Longo, C., Mercurio, M., Musco, L., & Marzano, C. N. (2004). Inventory and distribution of hard bottom fauna from the marine protected area of Porto Cesareo (Ionian Sea): Porifera and Polychaeta. *Italian Journal of Zoology*.
- Corriero, G., Longo, C., Mercurio, M., Nonnis Marzano, C., Lembo, G., & Spedicato, M. T. (2004). Rearing performance of *Spongia officinalis* on suspended ropes off the Southern Italian Coast (Central Mediterranean Sea). *Aquaculture*, 238(1–4), 195–205.
- Corsi, I., Mazzola, A., & Focardi, S. (2004). Mixed function oxidase activity and organochlorine levels in farmed sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*) from two intensive aquaculture facilities. *Aquaculture International*, 12, 357-375.
- Coughlan, J. (1969). The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology*.
- Crespi, V., & New, M. (2009). Cultured aquatic species fact sheets. FAO.
- Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2004). Total Serum Immunoglobulin M Levels Are Affected by

- Immunomodulators in Seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101, 203–210.
- Currie, D. R., McArthur, M. A., & Cohen, B. F. (2000). Reproduction and distribution of the invasive European fanworm *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae) in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology*, 136(4), 645–656.
- Dara, M., Dioguardi, M., Vazzana, M., Vazzana, I., Carbonara, P., Alfonso, S., Cammarata, M. (2023) The Role of Spatial Exploration and Territoriality in Establishing Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Hierarchies, and Their Effects upon Underlying Stress Physiology. *Fishes*, 8, 132
- de Boeck, G., Alsop, D., Wood, C. (2001) Cortisol effect on aerobic and anaerobic metabolism, nitrogen excretion and whole body composition in juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology* 74(4):858–868
- de Rosa, S., Crispino, A., de Giulio, A., Iodice, C., & Milone, A. (1995). Sulfated polyprenylhydroquinones from the sponge *Ircinia spinosula*. *Journal of Natural Products*.
- Duckworth, A. R., Brück, W. M., Janda, K. E., Pitts, T. P., & McCarthy, P. J. (2006). Retention efficiencies of the coral reef sponges *Aplysina lacunosa*, *Callyspongia vaginalis* and *Niphates digitalis* determined by Coulter counter and plate culture analysis. *Marine Biology Research*.
- Dunnett, C.W., 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association*, 50(272), pp.1096-1121.
- Ellis, A. E. (1998). Fish Immune System. In *Encyclopedia of Immunology*. (Delves, P. J., Roitt, I. M., eds), pp. 920–926 London.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C. I. M. (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology Biochemistry* 38:163–188
- Erwin, P. M., López-Legentil, S., & Turon, X. (2012). Ultrastructure, molecular phylogenetics, and chlorophyll a content of novel cyanobacterial symbionts in temperate sponges. *Microbial Ecology*, 64(3), 771–783.
- Erwin, P. M., López-Legentil, S., González-Pech, R., & Turon, X. (2012). A specific mix of generalists: bacterial symbionts in Mediterranean *Ircinia* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 619–637.
- Esmacili, M. (2021). Blood Performance: A New Formula for Fish Growth and Health. *Biology*, 10, 1–17.
- Esteves, A. I. S., Hardoim, C. C. P., Xavier, J. R., Gonçalves, J. M. S., & Costa, R. (2013). Molecular richness and biotechnological potential of bacteria cultured from *Irciniidae* sponges in the north-east Atlantic. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3), 519–536.
- FAO (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Franchi E., Renzoni A. (2003) Recycling energy from intensive fish farm wastewater by raising seaweed and molluscs. *International Workshop on Sustainable Aquaculture*, Siena, March 30th – April 1st 2003: 17.
- Fu, W., Sun, L., Zhang, X., & Zhang, W. (2006). Potential of the Marine Sponge *Hymeniacidon perleve* as a Bioremediator of Pathogenic Bacteria in Integrated Aquaculture Ecosystems. *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 1112–1122.
- Fu, W., Wu, Y., Sun, L., & Zhang, W. (2007). Efficient Bioremediation of Total Organic Carbon (TOC) in Integrated Aquaculture System by Marine Sponge *Hymeniacidon perleve*. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 1387–1397.

- Gaino, E., Bavestrello, G., Cattaneo-Vietti, R., & Sarà, M. (1994). Scanning electron microscope evidence for diatom uptake by two Antarctic sponges. *Polar Biology*, 14(1), 55-58.
- Gambi, M. C., Castelli, A., Giangrande, A., Lanera, P., Prevedelli, D., & Zunarelli Vandini, R. (1994, July). Polychaetes of commercial and applied interest in Italy: an overview. In *Actes de la 4eme Conference internationale des Polychetes. Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle de Paris* (Vol. 162, pp. 593-601).
- Ganga, R., Montero, D., Bell, J. G., Atalah, E., Ganuza, E., Vega-Orellana, O., Tort, L., Acerete, L., Afonso, J. M., Benitez-Sanatana, T., Fernández Vaquero, A., Izquierdo, M. (2011) Stress response in sea bream (*Sparus aurata*) held under crowded conditions and fed diets containing linseed and/or soybean oil. *Aquaculture*, 311 (1-4): 215-223
- Giacobbe, S., & Spano, N. (2003). Recovery of fan-shell beds proposed as a mitigation of marine fish-farming impacts. In *International Workshop on sustainable Aquaculture: Animal Welfare, Human Health and Interactions wi* (pp. 37-37).
- Giangrande (1997). Polychaete reproductive patterns, life cycles and life histories: an overview. *Oceanography and Marine Biology*. Vol, 35.
- Giangrande, A., & Gambi, M. C. (1998). Metamerism and life-style within polychaetes: Morpho-functional aspects and evolutionary implications. *Italian Journal of Zoology*, 65(1), 39-50.
- Giangrande, A., Cavallo, A., Licciano, M., Mola, E., Pierri, C., & Trianni, L. (2005). Utilization of the filter feeder polychaete *Sabella*. *Aquaculture International*, 13, 129-136.
- Giangrande, A., Gravina, M. F., Rossi, S., Longo, C., & Pierri, C. (2021). Aquaculture and restoration: Perspectives from mediterranean sea experiences. *Water*, 13(7), 991.
- Giangrande, A., Licciano, M., Arduini, D., Borghese, J., Pierri, C., Trani, R., Longo, C., Petrocelli, A., Ricci, P., Alabiso, G., Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Narracci, M., Stabili, L. (2022). An integrated monitoring approach to the evaluation of the environmental impact of an inshore mariculture plant (Mar Grande of Taranto, Ionian Sea). *Biology*. 11:617.
- Giangrande, A., Licciano, M., Arduini, D., Borghese, J., Pierri, C., Trani, R., Longo, C., Petrocelli, A., Ricci, P., Alabiso, G., Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Narracci, M., Stabili, L. (2022). An Integrated Monitoring Approach to the Evaluation of the Environmental Impact of an Inshore Mariculture Plant (Mar Grande of Taranto, Ionian Sea). *Biology*, 11(4), 617.
- Giangrande, A., Pierri, C., Arduini, D., Borghese, J., Licciano, M., Trani, R., Corriero, G., Basile, G., Cecere, E., Petrocelli, A., Stabili, L., & Longo, C. (2020). An innovative IMTA system: polychaetes, sponges and macroalgae co-cultured in a Southern Italian in-shore mariculture plant (Ionian Sea). *Journal of Marine Science and Engineering*.
- Giangrande, Adriana, Cavallo, A., & Pierri, C. (2007). Ammonium uptake of *Cladophora prolifera* (Chlorophyta, Cladophorales) a candidate species for bioremediation of aquaculture wastes. *Thalassia Salentina*, 30, 107-116.
- Gifford, S. P., MacFarlane, G. R., O'CONNOR, W. A., & Dunstan, R. H. (2006). Effect of the pollutants lead, zinc, hexadecane and octocosane on total growth and shell growth in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricata*. *Journal of Shellfish research*, 25(1), 159-165.
- Gifford, S., Dunstan, H., O'connor, W., & Macfarlane, G. R. (2005). Quantification of in situ nutrient and heavy metal remediation by a small pearl oyster (*Pinctada imbricata*) farm at Port Stephens, Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 50(4), 417-422.
- Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Roberts, T., & Toia, R. (2004). Pearl aquaculture—profitable

environmental remediation?. *Science of the total environment*, 319(1-3), 27-37.

- Gifford, S., Dunstan, R. H., O'Connor, W., Koller, C. E., & MacFarlane, G. R. (2007). Aquatic zooremediation: deploying animals to remediate contaminated aquatic environments. *Trends in Biotechnology*, 25(2), 60–65.
- Gifford, S., Macfarlane, G. R., Koller, C. E., Dunstan, R. H., & O'Connor, W. (2009). Zooremediation of contaminated aquatic systems through aquaculture initiatives. In *New Technologies in Aquaculture* (pp. 750-768). Woodhead Publishing.
- Gökalp, M., Kooistra, T., Rocha, M. S., Silva, T. H., Osinga, R., Murk, A. J., & Wijgerde, T. (2020). The effect of depth on the morphology, bacterial clearance, and respiration of the Mediterranean sponge *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847). *Marine Drugs*, 18(7), 358.
- Gomez Isaza, D.F., Cramp, R.L., Franklin, C.E. (2021) Exposure to Nitrate Increases Susceptibility to Hypoxia in Fish. *Physiological and Biochemical Zoology* 94(2): 124-142.
- Gordon, D. M., Birch, P. B., & McComb, A. J. (1980). The effect of light temperature and salinity on photosynthetic rates of an estuarine *Cladophora*. *Botanica Marina*, 23, 749–755.
- Granada, L., Sousa, N., Lopes, S., & Lemos, M. F. L. (2016). Is Integrated Multitrophic Aquaculture the Solution to the Sectors' Major Challenges? – A Review. *Reviews in Aquaculture*, 8, 283–300.
- Gregory, T.R. & Wood, C.M. (1999) The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology* 72:286–295
- Guerra-García, J. M., Hachero-Cruzado, I., González-Romero, P., Jiménez-Prada, P., Cassell, C., & Ros, M. (2016). Towards integrated multi-trophic aquaculture: lessons from caprellids (Crustacea: Amphipoda). *PLoS One*, 11(4), e0154776.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2019). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. [Http://Www.Algaebase.Org/](http://www.algaebase.org/).
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2019). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. [Http://Www.Algaebase.Org/](http://www.algaebase.org/).
- Hadas, E., Marie, D., Shpigel, M., & Ilan, M. (2006). Virus predation by sponges is a new nutrient-flow pathway in coral reef food webs. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1548–1550.
- Hadley, S., Wild-Allen, K., Johnson, C., & Macleod, C. (2015). Modelling macroalgae growth and nutrient dynamics for integrated multi-trophic aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 901–916.
- Hardoim, C. C. P., & Costa, R. (2014). Microbial communities and bioactive compounds in marine sponges of the family Irciniidae—a review. *Marine Drugs*, 12(10), 5089–5122.
- Hardoim, C. C. P., Esteves, A. I. S., Pires, F. R., Gonçalves, J. M. S., Cox, C. J., Xavier, J. R., & Costa, R. (2012). Phylogenetically and Spatially Close Marine Sponges Harbour Divergent Bacterial Communities. *PLoS ONE*.
- Hay, M. E. (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200(1–2), 103–134.
- Heath, A.G. (1995) *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, VPI and State University, Blacksburg 359 pp
- Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of

fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics, 125(1), pp.189-198.

- Hummel, H., Sepers, A. B., De Wolf, L., & Melissen, F. W. (1988). Bacterial growth on the marine sponge *Halichondria panicea* induced by reduced waterflow rate. Marine Ecology Progress Series, 42(2), 195-198.
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in Fish: A Review on Disease Development and Prevention. Journal of Aquatic Animal Health.
- Jegatheesan, V., Shu, L., & Visvanathan, C. (2011). Aquaculture Effluent: Impacts and Remedies for Protecting the Environment and Human Health. In Encyclopedia of Environmental Health. 123-135
- Jumah, Y. U. (2020). A review on waste absorption efficiency of different extractive integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) species: Implications in coastal and offshore aquaculture waste management. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 11(2), 257-264
- Kashulin, A., Seredkina, N., & Sørum, H. (2017). Cold-water vibriosis. The current status of knowledge. In Journal of Fish Diseases.
- Kefalas, E., Castritsi-Catharios, J., & Miliou, H. (2003). The impacts of scallop dredging on sponge assemblages in the Gulf of Kalloni (Aegean Sea, northeastern Mediterranean). ICES Journal of Marine Science, 60(2), 402-410.
- Kibria, A. S. M. (2016). Studies on Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) systems in freshwater ponds (Doctoral dissertation, PhD Thesis. Department of Aquaculture, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh).
- Knight-Jones, P., & Perkins, T. H. (1998). A revision of *Sabella*, *Bispira* and *Stylomma* (Polychaeta: Sabellidae). Zoological Journal of the Linnean Society, 123(4), 385-467.
- Krause-Jensen, D., Christensen, P. B., Rysgaard, S. S., Rysgaard, S. S., & Box, O. (1999). Oxygen and Nutrient Dynamics within Mats of the Filamentous Macroalga *Chaetomorpha linum*. Estuaries.
- Krause-Jensen, D., McGlathery, K., Rysgaard, S., & Christensen, P. B. (1996). Production within dense mats of the filamentous macroalga *Chaetomorpha linum* in relation to light and nutrient availability. Marine Ecology Progress Series, 134, 207-216.
- Lawton, R. J., Mata, L., de Nys, R., & Paul, N. A. (2013). Algal bioremediation of waste waters from land-based aquaculture using *Ulva*: selecting target species and strains. PLoS One, 8(10), e77344.
- Ledda, F. D., Manconi, R., & Pronzato, R. (2008). Retention rates on bacteria and organic matter by *Ircinia variabilis* (Demospongiae, Dictyoceratida) in experimental sponge farming for bioremediation. Biologia Marina Mediterranea, 15, 164-165
- Licciano, M., Stabili, L., & Giangrande, A. (2005). Clearance rates of *Sabella spallanzanii* and *Branchiomma luctuosum* (Annelida: Polychaeta) on a pure culture of *Vibrio alginolyticus*. Water Research, 39(18), 4375-4384.
- Licciano, M., Terlizzi, A., Giangrande, A., Cavallo, R. A., & Stabili, L. (2007). Filter-feeder macroinvertebrates as key players in culturable bacteria biodiversity control: a case of study with *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae). Marine environmental research, 64(4), 504-513.
- Liu, Y., Jung, J. H., Ji, H., & Zhang, S. (2006). Glycerolipids from a *Sarcotragus* species sponge. Molecules.
- Longo, C., Cardone, F., Corriero, G., Licciano, M., Pierri, C., & Stabili, L. (2016). The Co-Occurrence of the Demosponge *Hymeniacidon perlevis* and the Edible Mussel *Mytilus galloprovincialis* as a New Tool for

- Bacterial Load Mitigation in Aquaculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 3736–3746.
- Longo, C., Corriero, G., Licciano, M., & Stabili, L. (2010). Bacterial accumulation by the Demospongiae *Hymeniacidon perlevis*: A tool for the bioremediation of polluted seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 60(8), 1182–1187. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.03.035>
- Longo, C., Pierri, C., Mercurio, M., Trani, R., Cardone, F., Carbonara, P., Alfonso, S., & Stabili, L. (2022). Bioremediation capabilities of *Hymeniacidon perlevis* (Porifera, Demospongiae) in a land-based experimental fish farm. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(7), 874.
- Longo, C., Scrascia, M., Trani, R., Pierri, C., Cariglia, A., Cariglia, F., & Cariglia, M. (2020). ASMar: Assessment of Sponge Mariculture potential in polyculture system in the Manfredonia Gulf, from natural resources to IMTA toward bioremediation and animal welfare. *Aquafarm/Novelfarm Fiera*, Pordenone, 19-20 February 2020, 1.
- Longo, C., Trani, R., Aguilo-Arce, J., Ferriol, P., Puthod, P., & Pierri, C. (2023). Porifera in the REMEDIA LIFE Integrated Multitrophic Aquaculture (IMTA) System. *Biologia Marina Mediterranea*, in press.
- Longo, Caterina, Cardone, F., Corriero, G., Licciano, M., Pierri, C., & Stabili, L. (2016). The co-occurrence of the demosponge *Hymeniacidon perlevis* and the edible mussel *Mytilus galloprovincialis* as a new tool for bacterial load mitigation in aquaculture. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5587-z>
- Louisy, P. (2020). Guida all'identificazione dei pesci marini d'Europa e del Mediterraneo: 860 specie, 1450 foto, 1400 disegni. Il castello.
- Manconi, R., Cadeddu, B., Ledda, F., & Pronzato, R. (2013). An overview of the Mediterranean cave-dwelling horny sponges (Porifera, Demospongiae). *ZooKeys*.
- Manconi, R., Cubeddu, T., Corriero, G., & Pronzato, R. (1999). Commercial sponges farming as natural control of floating cages pollution. *New Species for Mediterranean Aquaculture*; Enne, G., Greppi, GF, Eds, 269-274.
- Marinho-Soriano, E., Azevedo, C. A. A., Trigueiro, T. G., Pereira, D. C., Carneiro, M. A. A., & Camara, M. R. (2011). Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and *Artemia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 253–257.
- McGlathery, K. J., Krause-Jensen, D., Rysgaard, S., & Christensen, P. B. (1997). Patterns of ammonium uptake within dense mats of the filamentous macroalga *Chaetomorpha linum*. *Aquatic Botany*.
- McGlathery, K. J., Pedersen, M. F., & Borum, J. (1996). Changes in intracellular nitrogen pools and feedback controls on nitrogen uptake in *Chaetomorpha linum* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*.
- Menéndez, M., Herrera, J., & Comín, F. A. (2002). Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (OF Müll), Kütz, in a Mediterranean Coastal Lagoon. *Scientia Marina*, 66(4), 355–364.
- Mercurio M., Scalera Liaci L., Corriero G. (2001). La fauna a poriferi del bacino della Strea di Porto Cesareo (LE). *Biologia Marina Mediterranea*, 8, 403–412.
- Mercurio, M., Corriero, G., Gherardi, M., Baldacconi, R., & Elda, G. (2013). Sexual reproduction in *Sarcotragus spinosulus* from two different shallow environments. *Marine Ecology*.
- Mhalhel, K., Levanti, M., Abbate, F., Laurà, R., Guerrero, M.C., Aragona, M., Porcino, C., Briglia, M., Germanà, A., Montalbano, G. (2023) Review on Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Aquaculture: Life Cycle, Growth, Aquaculture Practices and Challenges. *Journal of Marine Science and Engineering*, 11,

2008

- Mihopoulos, N., Vagias, C., Chinou, I., Roussakis, C., Scoullou, M., Harvala, C., & Roussis, V. (1999). Antibacterial and cytotoxic natural and synthesized hydroquinones from sponge *Ircinia spinosula*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*.
- Milanese, M., Chelossi, E., Manconi, R., Sarà, A., Sidri, M., & Pronzato, R. (2003). The Marine Sponge *Chondrilla nucula* Schmidt, 1862 as an Elective Candidate for Bioremediation in Integrated Aquaculture. *Biomolecular Engineering*, 20, 363–368.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Monn, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:211–268
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., Shpigel, M., & Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*.
- Neori, A., Shpigel, M., & Ben-Ezra, D. (2000). A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture*, 186(3–4), 279–291.
- Nissar, S., Bakhtiyar, Y., Arafat, M. Y., Andrabi, S., Mir, Z. A., Khan, N. A., & Langer, S. (2022). The evolution of integrated multi-trophic aquaculture in context of its design and components paving way to valorization via optimization and diversification. *Aquaculture*, 739074.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., D'Annibale, M. L., Pianetti, A., & Carraturo, A. (2013). A severe case of *Aeromonas veronii* biovar sobria travellers' diarrhoea characterized by vibrio parahaemolyticus co-isolation. *Journal of Medical Microbiology*.
- Pansini, M., & Longo, C. (2003). A review of the Mediterranean Sea sponge biogeography with, in appendix, a list of the demosponges hitherto recorded from this sea. *Biogeographia*.
- Pansini, M., & Longo, C. (2008). Checklist della fauna marina italiana. Porifera. *Biologia Marina Mediterranea*, 15, 44–70.
- Paul, B. G., & Vogl, C. R. (2011). Impacts of shrimp farming in Bangladesh: Challenges and alternatives. *Ocean & Coastal Management*, 54(3): 201-211
- Pedersen, M. F., & Borum, J. (1996). Nutrient control of algal growth in estuarine waters. Nutrient limitation and the importance of nitrogen requirements and nitrogen storage among phytoplankton and species of macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 142, 261–272.
- Pérez-Ruzafa, A., & Marcos, C. (2014). Ecology and distribution of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus 1758). *Biology of European Sea Bass*, 1.
- Perolo, A. (2015). Malattia nodulare branchiale, patologia emergente negli allevamenti italiani di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*). Tesi di laurea magistrale in Medicina Veterinaria Università di Padova, 95 pp.
- Pettit, G. R., Hoffmann, H., McNulty, J., Higgs, K. C., Murphy, A., Molloy, D. J., Herald, D. L., Williams, M. D., Pettit, R. K., Doubek, D. L., Hooper, J. N. A., Albright, L., Schmidt, J. M., Chapuis, J. C., and Tackett, L. P. (2004). Antineoplastic agents. 380. Isolation and X-ray crystal structure determination of isoaptamine from the Republic of Singapore *Hymeniacidon* sp. and conversion to the phosphate prodrug hystatin 1. *Journal of natural products*, 67(3), 506-509.
- Pile, A.J., Patterson, M. R., & Witman, J. D. (1996). In situ grazing on plankton <10 µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Marine Ecology Progress Series*, 141, 95-102.
- Pillay, T. V. R. (2008). *Aquaculture and the Environment*. John Wiley & Sons.

- Pita, L., López-Legentil, S., & Erwin, P. M. (2013). Biogeography and host fidelity of bacterial communities in *Ircinia* spp. from the Bahamas. *Microbial Ecology*, 66(2), 437–447.
- Pottinger, T.G. (2017). Modulation of the stress response in wild fish is associated with variation in dissolved nitrate and nitrite. *Environmental Pollution*, 225: 550-558.
- R Development Core Team. (2021). R Software.
- Raganato, P., Piccioli Resta, G., & Giangrande, A. (2001). Dati preliminari su *Sabella spallanzanii* Polychaeta: Sabellidae allevata in condizioni sperimentali. *Thalassia Salentina*, 25, 3–10.
- Reiswig, H. M. (1971). Particle Feeding in Natural Populations of Three Marine Demosponges. *The Biological Bulletin*, 141(3), 568–591.
- Reiswig, H. M. (1974). Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *Journal of experimental marine Biology and Ecology*, 14(3), 231-249.
- Ribes, M., Coma, R., & Gili, J. M. (1999). Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (Demospongiae, Dendroceratida) throughout an annual cycle. *Marine Ecology Progress Series*, 176, 179–190.
- Ridley, C. P., Bergquist, P. R., Harper, M. K., Faulkner, D. J., Hooper, J. N. A., & Haygood, M. G. (2005). Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont, *Oscillatoria spongelliae*. *Chemistry & Biology*, 12(3), 397–406.
- Riisgård, H., Larsen, P. (1995). Filter-feeding in marine macro-invertebrates: pump characteristics, modelling and energy cost. *Biological Reviews*.
- Riley, W. D., Ibbotson, A. T., Beaumont, W. R. C., Pawson, M. G., Cook, A. C., & Davison, P. I. (2011). Predation of the juvenile stages of diadromous fish by sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the tidal reaches of an English chalk stream. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(3), 307–312.
- Rønneseth A. et al. (2017). Comparative assessment of *Vibrio* virulence in marine fish larvae. doi:10.1111/jfd.12612
- Sadoul, B., & Vijayan, M. M. (2016). Stress and Growth. In *Fish Physiology* pp. 167–205 London: Elsevier Inc.
- Samaras, A., Espírito Santo, C., Papandroulakis, N., Mitrizakis, N., Pavlidis, M., Höglund, E., Pelgrim, T.N.M., Zethof, J., Spanings, F.A.T., Vindas, M.A., Ebbesson, L.O.E., Flik G. & Gorissen M. (2018) Allostatic Load and Stress Physiology in European Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Frontiers in Endocrinology* 9:451
- Sanz-Lázaro, C., & Marin, A. (2006). Benthic recovery during open sea fish farming abatement in Western Mediterranean, Spain. *Marine Environmental Research*.
- Sarà, M. (1966). Associazioni fra Poriferi e alghe in acque superficiali del litorale marino. *Ricerca Scient*, 36, 277–282.
- Sarà, M., & Liaci, L. (1964). Associazione fra la Cianoficea *Aphanocapsa feldmanni* e alcune Demospongie marine. *Italian Journal of Zoology*, 31(1), 55–65.
- Sarker, S. K., Yesmin, S., Kibria, A. S. M., & Haque, M. M. (2014). Comparative Productivity of Integrated Multi-trophic Aquaculture and Non-culture Pond Producing Freshwater Snail (*Viviparus Bengalensis* Lamarck). 6th Biennial Fisheries Conference and Research Fair, Bangladesh Fisheries Research Forum, 58.

- Schreck, C. B., & Tort, L. (2016). The Concept of Stress in Fish. In Fish physiology pp. 1–34 Elsevier.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W., & Fitzpatrick, M. S. (2001). Effects of Stress on Fish Reproduction, Gamete Quality, and Progeny. *Aquaculture*, 197, 3–24.
- Shpigel, M., Gasith, A., & Kimmel, E. (1997). A biomechanical filter for treating fish-pond effluents. *Aquaculture*.
- 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*. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90128-L](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90128-L)
- Smith, K. F., Behrens, M. D., Max, L. M., & Daszak, P. (2008). US drowning in unidentified fishes: scope, implications, and regulation of live fish import. *Conservation Letters*, 1(2), 103-109.
- Sorce, C., Leporatti, M. P., & Lenzi, M. (2018). Growth and physiological features of *Chaetomorpha linum* (Müller) Kütz. in high density mats. *Marine Pollution Bulletin*, 129(2), 772–781.
- Stabili L., Giangrande A., Arduini D., Borghese J., Petrocelli A., Alabiso G., Ricci P., Cavallo R.A., Acquaviva M I., Narracci M., Pierri C., Trani R., Longo C. (2023). Environmental quality improvement of a mariculture plant after its conversion into a multi-trophic system. *Science of the Total Environment*.
- Stabili, L., Giangrande, A., Arduini, D., Borghese, J., Petrocelli, A., Alabiso, G., Ricci, P., Cavallo, R.A., Acquaviva M.I., Narracci, M., Pierri, C., Trani, R., & Longo, C. (2023). Environmental quality improvement of a mariculture plant after its conversion into a multi-trophic system. *Science of The Total Environment*, 884, 163846.
- Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Longo, C., Mercurio, M., Marzano, C. N., & Corriero, G. (2006a). Filtering activity of *Spongia officinalis* var. *adriatica* (Schmidt) (Porifera, Demospongiae) on bacterioplankton: Implications for bioremediation of polluted seawater. *Water Research*, 40(16), 3083–3090.
- Stabili, L., Licciano, M., Giangrande, A., Fanelli, G., & Cavallo, R. A. (2006b). *Sabella spallanzanii* filter-feeding on bacterial community: ecological implications and applications. *Marine environmental research*, 61(1), 74-92.
- Stabili, L., Schirosi, R., Licciano, M., & Giangrande, A. (2009). The mucus of *Sabella spallanzanii* (Annelida, Polychaeta): Its involvement in chemical defence and fertilization success. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 374(2), 144-149.
- Stabili, L., Schirosi, R., Licciano, M., Mola, E., & Giangrande, A. (2010). Bioremediation of bacteria in aquaculture waste using the polychaete *Sabella spallanzanii*. *New biotechnology*, 27(6), 774-781.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. In *Food Microbiology*.
- Suau, P., & López Gómez, J. J. (1976). Contribución al estudio de la biología de la dorada, *Sparus auratus* L.
- Suau, P., & López Gómez, J. J. (1976). Contribución al estudio de la biología de la dorada, *Sparus auratus*.
- Taylor, R., Fletcher, R. L., & Raven, J. A. (2001). Preliminary studies on the growth of selected ‘green tide’algae in laboratory culture: effects of irradiance, temperature, salinity and nutrients on growth rate.
- Topçu, N. E., Pérez, T., Grégori, G., & Harmelin-Vivien, M. (2010). In situ investigation of *Spongia officinalis* (Demospongiae) particle feeding: Coupling flow cytometry and stable isotope analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

- Troell, M., Joyce, A., Chopin, T., Neori, A., Buschmann, A. H., & Fang, J. G. (2009). Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. In *Aquaculture*. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.09.010>
- Tsoukatou, M., Hellio, C., Vagias, C., Harvala, C., & Roussis, V. (2002). Chemical defense and antifouling activity of three Mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*.
- Tsutsui, I., Miyoshi, T., Aue-umneoy, D., Songphatkaew, J., Meeanan, C., Klomkling, S., Sukchai, H., Pinphoo, P., Yamaguchi, I., & Ganmanee, M. (2015). High tolerance of *Chaetomorpha* sp. to salinity and water temperature enables survival and growth in stagnant waters of central Thailand. *International Aquatic Research*, 7(1), 47–62.
- Uchiyama H. (2000). Distribution of *Vibrio* Species Isolated from Aquatic Environments with TCBS Agar. doi: 10.1007/BF02931258.
- UNI EN ISO 7899-2:2000. Qualità dell'acqua - Conteggio di enterococchi intestinali.
- UNI EN ISO 9308-1:2014. Qualità dell'acqua - Conteggio di *Escherichia coli* e batteri coliformi.
- UNI EN ISO 9308-2:2012. Qualità dell'acqua - Conteggio di *Escherichia coli* e batteri coliformi.
- Uriz, M. J. (1982). Reproduction of *Hymeniacidon sanguinea* (Grant, 1926): Larval behaviour and postlarval development [sponge]. *Investigacion Pesquera* (Spain).
- Van de Vyver, G., Vray, B., Belaouane, S., & Toussaint, D. (1990). Efficiency and selectivity of microorganism retention by *Ephydatia fluviatilis*. (K. Rutzer (ed.); New Perspe). Smithsonian Institution Press.
- Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., de Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., & Hooper, J. N. A. (2012). Global diversity of sponges (Porifera). In *PLoS ONE*.
- Wabnitz, C. (2003). From ocean to aquarium: the global trade in marine ornamental species (No. 17). UNEP/Earthprint.
- Weisz, J. B., Hentschel, U., Lindquist, N., & Martens, C. S. (2007). Linking abundance and diversity of sponge-associated microbial communities to metabolic differences in host sponges. *Marine Biology*, 152(2), 475–483.
- Wilkinson, C. R. (1978). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Marine Biology*.
- Wollgiehn, R., & Reinert, B. P. J. (1980). *Chloroplasts*. Springer.
- Xu, Y., & Lin, J. (2008). Effect of temperature, salinity, and light intensity on the growth of the green macroalga, *Chaetomorpha linum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(6), 847–851.
- Xue, S., Zhang, H. T., Wu, P. C., Zhang, W., & Yuan, Q. (2004). Study on bioactivity of extracts from marine sponges in Chinese Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298(1), 71-78.
- Yada, T., & Tort, L. (2016). Stress and Disease Resistance: Immune System and Immunoendocrine Interactions. In *Fish Physiology* pp. 365–403 Elsevier Inc.
- Yang, J., Sun, J., Lee, O. O., Wong, Y. H., & Qian, P. Y. (2011). Phylogenetic diversity and community structure of sponge-associated bacteria from mangroves of the Caribbean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 62(3), 231–240.

- Zhang, J., & Kirkham, M. B. (1996). Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *New Phytologist*, 132(3), 361–373.
- Zhang, X., Zhang, W., Xue, L., & Zhang, B., Jin, M., Fu, W. (2010). Bioremediation of bacteria pollution using the marine sponge *Hymeniacidon perlevis* in the intensive mariculture water system of turbot *Scophthalmus maximus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 59–68.
- Zheng, L., Yan, X., Han, X., Chen, H., Lin, W., Lee, F. S., & Wang, X. (2006). Identification of norharman as the cytotoxic compound produced by the sponge (*Hymeniacidon perleve*)-associated marine bacterium *Pseudoalteromonas piscicida* and its apoptotic effect on cancer cells. *Biotechnology and applied biochemistry*, 44(3), 135-142.
- Zhou, Y., Yang, H., Hu, H., Liu, Y., Mao, Y., Zhou, H., Xu, X., & Zhang, F. (2006). Bioremediation potential of the macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal waters of north China. *Aquaculture*, 252(2–4), 264–276.



FEAMP
PO 2014-2020
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

Dipartimento di Medicina Veterinaria

PO FEAMP 2014/2020

Misura **2.47** - Innovazione art. **47** Reg. **508/2014**

Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20

APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE

ATTIVITÀ 4 Indagine sugli aspetti ambientali e sanitari

La valutazione ambientale e sanitaria specificamente condotta nell'aree marine costiere del Golfo di Taranto individuate nella presente proposta progettuale e nei prototipi di allevamento, prevede la determinazione quali-quantitativa di contaminanti "convenzionali" ed emergenti (metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici (PAH) e policlorobifenili (PCB) fitofarmaci e microplastiche), eventualmente presenti nella colonna d'acqua e nei sedimenti, che costituiscono un potenziale rischio per la salute dell'ecosistema marino nonché per la sicurezza degli alimenti a causa dei fenomeni di bioaccumulo nelle parti edibili delle specie destinate al consumo umano.

Gli stessi contaminanti, pertanto, saranno ricercati in esemplari di *Paracentrotus lividus*, in quanto tale specie risulta essere molto sensibile a diversi tipi di inquinamento e, quindi, un ottimo bioindicatore dello stato di salute ambientale ed in *Ostrea edulis*, con particolare riferimento alle microplastiche, considerate le numerose pubblicazioni presenti nella letteratura scientifica internazionale e le opinioni dell'European Food Safety Authority che dimostrano che gli organismi filtratori e, peculiarmente i molluschi bivalvi, sono in grado di sequestrare e bio-concentrare elevate quantità di tali contaminanti.

Inoltre, saranno condotte analisi sulle acque dei prototipi innovativi per quanto attiene la presenza di microelementi e composti chimici che possono interferire con l'indice di accrescimento e l'indice di mortalità delle specie di interesse comparando le concentrazioni relative con gruppi di controllo allevati con differenti tipologie di acqua di mare pulita (naturale vs artificiale) al fine di evidenziare le condizioni di allevamento ottimali per l'accrescimento delle forme giovanili di *Paracentrotus lividus* e *Ostrea edulis*.

Al fine di effettuare la valutazione della contaminazione ambientale sono stati dapprima prelevati 6 campioni di acqua e sedimenti nelle 2 zone individuate nell'ambito dell'Attività 2, ovvero l'area di Cerano (BR) e il Golfo di Taranto nel periodo compreso tra maggio 2022 e marzo 2023.

Per l'acqua marina, il campionamento è stato condotto conformemente a quanto indicato in:

- UNI EN ISO 5667-1 Qualità dell'acqua – Campionamento – Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento. 4
- EN ISO 5667-3 Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples.
- EN ISO 5667- 6 Water Quality – Sampling – Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams.
- EN ISO 5667- 6 Water Quality – Sampling – Part 14: Guidance on quality assurance of environmental water sampling and handling.

Sono state impiegate bottiglie ambrate in vetro Pirex da 2 l. I campioni sono stati stoccati e trasportati in regime di refrigerazione presso la Sezione di Sicurezza degli Alimenti del Dipartimento di Medicina Veterinaria e analizzati entro le 24 ore. Per la determinazione quantitativa dei parametri di seguito riportati, le analisi sono state condotte presso il laboratorio di prova, accreditato per la Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 da ACCREDIA, Studio Summit S.r.l. di Avellino, CERTIFICATO DI ACCREDITAMENTO 1013L REV. 05 (Expiring date 12-03-2026).

Il trasferimento dei campioni presso tale laboratorio di prova è stato effettuato a 4 °C mediante frigorifero elettrico portatile, inserendo un dispositivo data-logger per verificare il corretto mantenimento della temperatura di refrigerazione durante il trasporto.

I contaminanti ricercati sono:

- Idrocarburi Policiclici Aromatici = PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons)
- Policlorobifenili = PCB

La determinazione quantitativa di PAH e PCB è stata eseguita secondo EPA-Method 1668C for determination of chlorinated biphenyl congeners (CBs) in waste water and other matrices by High-Resolution Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry (HRGC/HRMS), che prevede una prima fase di purificazione/clean-up mediante Solid-Phase Extraction (SPE) e la successiva lettura dell'eluato in HRGC/HRMS.

- Metalli pesanti (Cadmio e Piombo) secondo la Metodica UNI EN ISO 17194-2:2005. La misurazione quantitativa è stata eseguita mediante spettrometro con eccitazione a plasma ad accoppiamento induttivo con detector a scansione di massa (ICP-MS) Perkin-Elmer Elan DRC II dotato di cella di reazione.

In relazione ai sedimenti, invece, l'indagine è stata condotta su campioni di sedimento prelevati negli stessi punti di campionamento dell'acqua di mare.

I campioni sono stati prelevati mediante un carotatore in alluminio, avente diametro di 10 mm, lungo 20 cm, munito di 2 tappi ermetici sempre in alluminio. Successivamente, i campioni sono stati trasportati in laboratorio in contenitori in PVC, alla temperatura di 4 °C. È stata prelevata la frazione pelitica ($\varnothing < 63 \mu\text{m}$), su cui è stata effettuata l'analisi chimica per valutare la presenza di PAH e PCB secondo le metodiche sopra riportate.

Le analisi sui campioni di *Paracentrotus lividus* sono state condotte su esemplari adulti prelevati nei mesi di maggio e ottobre 2022 nell'ambito dei campionamenti effettuati per l'ATTIVITÀ 2 nel Golfo di Taranto. Si è proceduto al reperimento di un numero sufficiente di esemplari da destinare alle indagini analitiche sotto riportate.

I campioni prelevati sono stati posti in contenitori in vetro Pyrex, muniti di tappi in vetro per evitare cross-contaminazioni da materiale plastico, e trasportati in regime di refrigerazione, come già sopra descritto per i campioni di acqua e sedimenti.

È stato misurato il diametro del dermascheletro degli esemplari catturati che è risultato compreso nell'intervallo tra 70,0 – 90,0 mm. Quindi si è proceduto al prelievo della porzione edibile (gonadi), di seguito denominata polpa.

Sono stati misurati i valori medi di acqua libera (a_w) risultati pari a 0,97 per il campionamento di maggio e 0,98 per il campionamento di ottobre e di pH, compreso tra 6,1-6,4 per entrambi i campionamenti eseguiti.

In particolare, sono stati ricercati i seguenti parametri

- Organofosfati e carbammati: è stata impiegata la Metodica AOAC Official Method 2007.01 (Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate), che prevede una prima fase di clean up con il metodo QuEChERS e purificazione mediante dispersive-SPE (Dispersive-solid-phase extraction) e la successiva detezione quantitativa in GC/MS e/o LC/Tandem MS a seconda della molecola ricercata.
- Antibiotici: la determinazione quali-quantitativa è stata condotta esclusivamente sugli esemplari di *Paracentrotus lividus* attraverso una metodica di screening che utilizza il kit Premi®Test 25, R-Biopharm AG.
- Microplastiche: la fase di purificazione è stata eseguita mediante la metodica di clean up proposta da Roch S. and Brinker A. "Rapid and Efficient method for the detection of microplastic in the gastrointestinal tract of fishes". Il filtrato ottenuto è stato quindi analizzato allo stereoscopio binoculare (20x) al fine di evidenziare la presenza di microplastiche.

Per ciascuno dei metodi analitici impiegati sono descritte le sostanze/congeneri/molecole ricercate e viene riportato il Limite di Quantificazione (LOQ) calcolato per la validazione della metodica.

I risultati delle indagini analitiche condotte sono elencati nelle tabelle riportate in ANNESSO I.

Per gli aspetti sanitari legati alla presenza di inquinanti chimici nelle parti edibili (cioè, le gonadi) del riccio di mare, la ricerca di Organofosfati (Dichlorvos, MOCAP (ethoprophos), Disulfoton, Methyl parathion, Ronnel) e Carbammati (Aldicarb sulfoxide, Aldicarb sulfone, Oxamyl, Metomil, Aldicarb)

è stata effettuata in pool sulla polpa degli esemplari catturati nei campionamenti di fine ottobre 2022 e di marzo-aprile 2023 (rispettivamente CAMPIONE 1R e 2R).

Il metodo analitico per la determinazione quantitativa degli organofosfati e dei carbammati è stato dapprima validato sulla matrice riccio di mare: di seguito, si riportano i parametri relativi al Limite di detezione (LOD), Limite di Quantificazione (LOQ), coefficiente di determinazione (R^2), Recupero (%), effetto matrice ME (%), precursor ion (m/z), and product ion (m/z) per singolo analita.

Validazione della metodica per la ricerca di Organofosfati nel riccio di mare.

Analita	Coefficient of determination (R^2)	Limit of quantification (LOQ) ($\mu\text{g/L}$)	Limit of detection (LOD) ($\mu\text{g/L}$)	Recupero (%)		ME (%)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
				50 ($\mu\text{g/L}$)	100 ($\mu\text{g/L}$)			
Dichlorvos	0.9996	97.15	18.32	77.90 \pm 9.17	64.27 \pm 6.74	82	183	95
MOCAP (ethoprophos)	0.9995	90.28	27.29	69.29 \pm 8.67	70.64 \pm 9.52	77	244	177
Disulfoton	0.9998	55.34	31.84	81.30 \pm 6.92	88.26 \pm 10.32	92	277	64
Methyl parathion	0.9997	70.23	21.23	92.89 \pm 6.78	73.19 \pm 9.32	90	269	127
Ronnel	0.9996	100.62	28.53	88.27 \pm 8.39	77.66 \pm 7.83	88	234	197

Validazione della metodica per la ricerca di Carbammati nel riccio di mare.

Analita	Coefficient of determination (R^2)	Limit of detection (LOD) ($\mu\text{g/L}$)	Recupero %		Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
			50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$		
Aldicarb sulfoxide	0.9998	1	84.44 \pm 5.69	98.65 \pm 5.58	209	174
Aldicarb sulfone	0.9994	1	88.87 \pm 2.90	91.96 \pm 4.89	244	144
Oxamyl	0.9998	0.8	83.98 \pm 3.97	82.56 \pm 3.42	167	119
Methomyl	0.9997	0.9	91.94 \pm 4.97	81.56 \pm 4.98	161	111
Aldicarb	0.9995	0.8	68.53 \pm 3.75	67.76 \pm 4.97	210	119

Tutte le molecole ricercate sono risultate non rilevabili dal metodo analitico messo a punto nei 2 pool di campioni di riccio di mare analizzati.

La ricerca di Antibiotici è stata effettuata in pool sulla polpa degli esemplari catturati nei due campionamenti eseguiti (CAMPIONE 1R e 2R). La preparazione del campione è stata eseguita secondo le indicazioni del produttore, testando preliminarmente un controllo positivo, ovvero un campione di polpa di ricci fortificato mediante l'aggiunta di quantità note degli standard di antibiotici testati.

Antibiotici ricercati nei campioni *Paracentrotus lividus* mediante Premi®Test 25, R-Biopharm AG.

CAMPIONE	Antibiotici	Unità di misura	Risultato
1R	Thiamphenicol	mg/kg	ND
	Streptomycin	mg/kg	ND
	Tylosin	mg/kg	ND
	Quinolone	mg/kg	ND
	Ceftiofur	mg/kg	ND
	Tetracyclines	mg/kg	ND
2R	Thiamphenicol	mg/kg	ND
	Streptomycin	mg/kg	ND
	Tylosin	mg/kg	ND
	Quinolone	mg/kg	ND
	Ceftiofur	mg/kg	ND
	Tetracyclines	mg/kg	ND

ND = Not Detectable

Per la ricerca qualitativa di microplastiche è stato utilizzato il metodo proposto da Roch S. and Brinker A. che è stato adattato al *Paracentrotus lividus*. Pertanto, i campioni trasportati in regime di refrigerazione sono stati immediatamente analizzati e preliminarmente è stato effettuato un lavaggio con acqua ultrapura per rimuovere la potenziale di microplastiche sul dermascheletro esterno.

Per i due campionamenti eseguiti (1R e 2R) sono stati analizzati 3 esemplari. Ogni riccio di mare è stato sezionato in un vassoio di metallo utilizzando forbici di acciaio inossidabile. La dissezione è iniziata con un taglio superficiale a forma di circonferenza attorno alla bocca, per evitare danni al tessuto interno. Successivamente, i tratti digestivi e le gonadi sono stati separati e posti in becher di vetro puliti e immediatamente coperti con vetrini da orologio e fogli di alluminio per ridurre al minimo il rischio di contaminazione ambientale.

È stata, quindi, effettuata una prima digestione con soluzione 1M di idrossido di sodio per 15 minuti a 50 °C a 100 RPM; la neutralizzazione della soluzione utilizzata con acido nitrico (65%) e acqua ultrapura per 15 minuti con aumento graduale della temperatura da 50°C a 80°C per garantire la rimozione dei solidi sospesi più resistenti; la diluizione 1:2 (v/v) con acqua ultrapura a 80 °C e, infine, la filtrazione sottovuoto attraverso filtri di nitrocellulosa (dimensione dei pori 1 µm).

Il filtrato è stato analizzato allo stereomicroscopio (Nikon, Italy) munito di camera per acquisizione delle immagini (Nikon X_Entry).

Sono state ricercate le seguenti tipologie di microplastiche:

- frammento: porzione di plastica dura rotta; può avere contorno sub-circolare, angolare, sub-angolare;

- filamento/fibra(tessile): elemento filiforme, flessibile, di forma allungata, sottile;
- foglio/film, porzione di plastica morbida rotta spesso di forma angolare o sub-angolare, sottile;
- pellet/beads, particella di forma cilindrica, ovoidale, discoidale, sferuloide, sferica irregolare o liscia, di consistenza dura;
- foam/pallina polistirolo, particelle di forma irregolare o sferoidale di consistenza morbida.

Nessuna delle tipologie di microplastiche ricercate è stata evidenziata nei campioni analizzati.

In conclusione, tutte le indagini analitiche sopra riportate eseguite su acqua di mare, sedimenti e campioni di *Paracentrotus lividus* hanno dato esito negativo.

Pertanto, è possibile desumere, esclusivamente per quanto attiene i parametri chimici sottoposti ad indagine, che nelle zone in cui è stato effettuato il campionamento, la qualità ambientale non presenti rischi chimici di carattere sanitario.

L'assenza di microplastiche nei campioni di riccio di mare analizzati è in linea con quanto riportato in bibliografia: i molluschi bivalvi rappresentano, ad oggi, la specie in cui esiste e persiste il bioaccumulo di microplastiche distribuite nella colonna d'acqua per la peculiare attività di filtrazione cui sono soggetti.

Infine, a latere delle analisi condotte durante l'ATTIVITÀ 4, sono state effettuate valutazioni analitiche relative all'acqua di mare artificiale nell'impianto per l'allevamento dei ricci di mare allestito nella stazione mobile sita presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria, al fine di ottimizzare le condizioni di gestione e allevamento del riccio di mare.

Valori rilevati nelle acque della stazione mobile.

CAMPIONE	pH	Azoto nitroso (N-NO ₂) (mg/l)	Azoto nitrico (N-NO ₃) (mg/l)	Ione ammonio (mg/l)	Ossigeno disciolto (mg/l)
marzo 2023	8,26	0,0673	Non rilevabile	Non rilevabile	0,85
aprile 2023	7,97	0,3204	4,6613	Non rilevabile	0,68
maggio 2023	8,34	0,0823	Non rilevabile	Non rilevabile	0,82
giugno 2023	8,44	0,1294	8,1493	Non rilevabile	0,93



**REGIONE
PUGLIA**



FEAMP
PO 2014-2020
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO**

**DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA**

**PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA
INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023**

ANNESNO I



Dati biometrici della popolazione di riccio di mare costituita per la sperimentazione nel periodo marzo-ottobre 2022

	Area di Cerano (BR)		Golfo di Taranto	
	diametro (cm)	peso totale (g)	diametro (cm)	peso totale (g)
1	7,0	31,84	7,0	32,60
2	7,1	33,75	7,1	31,50
3	7,2	35,66	7,2	32,40
4	7,5	41,39	7,3	31,30
5	7,0	31,85	7,2	32,30
6	7,6	43,29	7,0	31,45
7	7,4	39,48	7,1	31,25
8	7,2	35,60	7,0	32,10
9	8,5	60,48	7,5	34,25
10	8,1	52,84	7,1	32,16
11	8,4	58,57	7,4	33,73
12	7,8	47,11	7,0	32,65
13	7,9	49,02	7,0	31,58
14	8,5	60,45	7,5	34,30
15	8,0	50,93	7,0	31,47
16	8,1	52,80	7,1	32,20
17	8,2	54,75	7,2	33,25
18	8,0	50,90	7,0	31,59
19	8,2	54,70	7,2	32,68
20	7,9	49,10	7,0	31,65
21	8,0	50,80	7,0	31,84
22	8,1	52,56	7,1	32,30
23	9,0	70,03	8,0	36,86
24	8,6	62,39	7,6	34,78
25	8,7	64,30	7,7	35,29
26	7,1	33,74	7,0	31,64
27	8,5	60,42	7,5	34,70
28	8,6	62,35	7,6	34,75
29	8,2	54,65	7,2	32,68
30	7,3	37,57	7,0	35,23
31	7,0	31,83	7,0	31,85
32	7,1	33,72	7,0	31,94
33	7,5	41,35	7,0	30,67
34	7,0	31,86	7,0	31,76
35	7,5	71,36	7,0	36,40
36	7,6	43,20	8,5	41,20
37	7,5	41,38	7,5	34,58
38	8,2	54,78	7,5	33,32
39	8,0	50,60	8,0	37,56
40	8,3	56,66	8,0	35,60



Dati biometrici della popolazione di riccio di mare costituita per la sperimentazione nel periodo marzo-ottobre 2023

	Area di Cerano (BR)		Golfo di Taranto	
	diametro (cm)	peso totale (g)	diametro (cm)	peso totale (g)
1	8,0	50,93	7,3	33,00
2	7,0	30,80	7,4	33,73
3	8,2	54,75	7,5	34,23
4	8,0	51,00	7,6	34,77
5	8,0	50,00	7,5	34,22
6	7,7	45,20	7,3	33,20
7	8,4	58,57	7,4	33,73
8	7,5	41,39	7,3	33,30
9	9,0	70,03	7,8	35,82
10	7,2	35,66	7,4	33,73
11	8,7	64,30	7,7	35,29
12	7,0	31,50	7,3	33,40
13	8,9	68,00	7,3	33,50
14	8,8	66,21	7,8	35,67
15	7,0	31,20	7,3	33,60
16	8,6	62,39	7,4	33,73
17	7,0	31,36	7,5	35,00
18	8,5	60,48	7,3	33,25
19	7,2	36,00	7,5	34,00
20	8,9	68,12	7,3	33,36
21	7,0	31,35	7,3	33,34
22	7,6	43,29	7,4	33,73
23	8,0	51,40	8,3	38,43
24	8,1	52,84	7,9	36,34
25	7,7	45,30	8,0	36,86
26	7,1	33,75	7,3	33,25
27	7,5	41,26	7,8	35,96
28	8,1	52,90	7,9	36,42
29	7,2	35,34	7,5	34,50
30	7,0	31,56	7,3	33,26
31	7,0	31,59	7,3	33,47
32	7,1	33,60	7,3	33,52
33	7,0	31,45	7,3	33,68
34	7,0	31,67	7,3	33,78
35	7,0	31,75	7,3	33,95
36	7,1	33,50	7,3	33,64
37	7,0	31,95	7,3	33,57
38	7,7	45,60	7,5	34,85
39	7,0	31,52	7,3	33,00
40	7,8	47,11	7,6	34,77



Risultati presenza di Idrocarburi Policiclici Aromatici = PAH nei campioni di acqua di mare prelevati presso CERANO (BR) (1A-6A) e GOLFO DI TARANTO (7A-12A)

CAMPIONE	SOSTANZA	LOQ (µg/l)	Risultato (µg/l)
1A MAGGIO 2022	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
2A LUGLIO 2022	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
3A OTTOBRE 2022	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
4A GENNAIO 2023	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
5A FEBBRAIO 2023	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
6A MARZO 2023	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
7A MAGGIO 2022	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
8A LUGLIO 2022	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND



	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
9A OTTOBRE 2022	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
10A GENNAIO 2023	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
11A FEBBRAIO 2023	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND
12 A MARZO 2023	Naftalene	0.6	ND
	Antracene	0.03	ND
	Fluorantene	0.002	ND
	Benzo [a] pirene	0.00005	ND
	Benzo [b] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [k] fluorantene	0.005	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0.00025	ND

ND = Not Detectable



Risultati presenza di Policlorobifenili (PCB) nei campioni di acqua di mare prelevati presso CERANO (BR) (1A-6A) e GOLFO DI TARANTO (7A-12A)

CAMPIONE	PCB	LOQ (µg/l)	Risultato (µg/l)
1A MAGGIO 2022	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
2A LUGLIO 2022	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
3A OTTOBRE 2022	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
4A GENNAIO 2023	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
5A FEBBRAIO 2023	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
6A MARZO 2023	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
7A MAGGIO 2022	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
8A LUGLIO 2022	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND



REGIONE
PUGLIA



FEAMP
Fondo europeo per gli
affari marittimi e la pesca



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DIPARTIMENTO DI BIOSCIENZE,
BIOTECNOLOGIE E AMBIENTE
DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA

PO FEAMP 2014/2020 • Misura 2.47 - Innovazione art. 47 Reg. 508/2014 • APPROCCI INNOVATIVI PER UNA ACQUACOLTURA INTEGRATA E SOSTENIBILE • Numero Identificativo Progetto: 0003/INA/20 • Relazione Finale Tecnico-Scientifica • Novembre 2023

	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
9A OTTOBRE 2022	PCB 52	0.0001	ND
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
	10A GENNAIO 2023	PCB 52	0.0001
PCB 77		0.0001	ND
PCB 81		0.0001	ND
PCB 128		0.0001	ND
PCB 138		0.0001	ND
PCB 153		0.0001	ND
PCB 169		0.0001	ND
11A FEBBRAIO 2023		PCB 52	0.0001
	PCB 77	0.0001	ND
	PCB 81	0.0001	ND
	PCB 128	0.0001	ND
	PCB 138	0.0001	ND
	PCB 153	0.0001	ND
	PCB 169	0.0001	ND
	12 A MARZO 2023	PCB 52	0.0001
PCB 77		0.0001	ND
PCB 81		0.0001	ND
PCB 128		0.0001	ND
PCB 138		0.0001	ND
PCB 153		0.0001	ND
PCB 169		0.0001	ND

ND = Not Detectable



Risultati presenza di Cadmio e Piombo nei campioni di acqua di mare prelevati presso CERANO (BR) (1A-6A) e GOLFO DI TARANTO (7A-12A)

CAMPIONE	SOSTANZA	LOQ (µg/l)	Risultato (µg/l)
1A MAGGIO 2022	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
2A LUGLIO 2022	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
3A OTTOBRE 2022	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
4A GENNAIO 2023	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
5A FEBBRAIO 2023	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
6A MARZO 2023	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
7A MAGGIO 2022	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
8A LUGLIO 2022	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
9A OTTOBRE 2022	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
10A GENNAIO 2023	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
11A FEBBRAIO 2023	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND
12 A MARZO 2023	CADMIO	0.06	ND
	PIOMBO	0.4	ND



Risultati presenza di Idrocarburi Policiclici Aromatici = PAH nei campioni di sedimenti prelevati presso CERANO (BR) (1S-6S) e GOLFO DI TARANTO(7S-12S)

CAMPIONE	SOSTANZA	LOQ (mg/l)	Risultato (mg/l)
1S MAGGIO 2022	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
2S LUGLIO 2022	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
3S OTTOBRE 2022	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
4S GENNAIO 2023	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
5S FEBBRAIO 2023	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
6S MARZO 2023	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
7S MAGGIO 2022	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
8S LUGLIO 2022	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND



	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
9S OTTOBRE 2022	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
10S GENNAIO 2023	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
11S FEBBRAIO 2023	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND
12 S MARZO 2023	Naftalene	0,001	ND
	Antracene	0,001	ND
	Fluorantene	0,001	ND
	Benzo [a] pirene	0,001	ND
	Benzo [b] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [k] fluorantene	0,001	ND
	Benzo [g,h,i] perilene	0,001	ND

ND = Not Detectable



Risultati presenza di Policlorobifenili (PCB) nei campioni di sedimenti prelevati presso CERANO (BR) (1S-6S) e GOLFO DI TARANTO(7S-12S)

CAMPIONE	PCB	LOQ (µg/kg)	Risultato (µg/kg)
1S MAGGIO 2022	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
2S LUGLIO 2022	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
3S OTTOBRE 2022	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
4S GENNAIO 2023	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
5S FEBBRAIO 2023	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
6S MARZO 2023	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
7S MAGGIO 2022	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
8S LUGLIO 2022	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND



	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
9S OTTOBRE 2022	PCB 52	0.002	ND
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
	10S GENNAIO 2023	PCB 52	0.002
PCB 77		0.002	ND
PCB 81		0.002	ND
PCB 128		0.002	ND
PCB 138		0.002	ND
PCB 153		0.002	ND
PCB 169		0.002	ND
11S FEBBRAIO 2023		PCB 52	0.002
	PCB 77	0.002	ND
	PCB 81	0.002	ND
	PCB 128	0.002	ND
	PCB 138	0.002	ND
	PCB 153	0.002	ND
	PCB 169	0.002	ND
	12 S MARZO 2023	PCB 52	0.002
PCB 77		0.002	ND
PCB 81		0.002	ND
PCB 128		0.002	ND
PCB 138		0.002	ND
PCB 153		0.002	ND
PCB 169		0.002	ND

ND = Not Detectable



Risultati presenza di Cadmio e Piombo nei campioni di sedimenti prelevati presso CERANO (BR) (1S-6S) e GOLFO DI TARANTO(7S-12S)

CAMPIONE	SOSTANZA	LOQ (mg/kg)	Risultato (mg/kg)
1S MAGGIO 2022	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
2S LUGLIO 2022	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
3S OTTOBRE 2022	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
4S GENNAIO 2023	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
5S FEBBRAIO 2023	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
6S MARZO 2023	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
7S MAGGIO 2022	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
8S LUGLIO 2022	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
9S OTTOBRE 2022	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
10S GENNAIO 2023	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
11S FEBBRAIO 2023	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND
12 S MARZO 2023	CADMIO	0.03	ND
	PIOMBO	8	ND

ND = Not Detectable