

RELAZIONE CONCLUSIVA DEL PROGETTO IN CONVENZIONE

Censimento, caratterizzazione, controllo e valorizzazione del Gambero rosso della Luisiana (*Procambarus clarkii*) in Sicilia

(Mis. 2.49 – art. 49 – PO FEAMP SICILIA 2014-2020)



Soggetto attuatore: Università degli Studi di Palermo – Dipartimento di Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF)

Indice

Sommario

Introduzione	4
La specie	4
Articolazione del progetto.....	5
Work-packages e voci di spesa	6
WP1: Aggiornamento delle informazioni distribuzionali della specie in Sicilia.....	9
WP1.1 Raccolta e analisi delle informazioni bibliografiche e Citizen science	9
WP1.1a Review della letteratura scientifica esistente su <i>Procambarus clarkii</i> in Sicilia	10
WP1.1b Ricerca nei <i>social media</i>	12
WP1.2 Aggiornamento delle informazioni distribuzionali della specie in Sicilia.....	13
WP1.2a Censimento tramite ricerca di segni di presenza e cattura	13
WP1.2b Verifica della presenza di <i>Procambarus clarkii</i> attraverso l'analisi del DNA ambientale	21
WP2: Stima della struttura e della fenologia di popolazioni selezionate.....	26
WP3: Analisi della struttura genetica dei popolamenti siciliani della specie	38
WP4: Individuazione delle aree dove è possibile e prioritario intervenire con azioni di controllo o eradicazione	43
Area di studio e unità di riferimento	45
Stima della superficie idrica all'interno dei quadrati di riferimento	45
Presenza di habitat ai sensi della Direttiva (92/43/CEE)	47
Presenza di aree tutelate	48
Analisi complessiva della sensibilità	49
Distanza dal punto di presenza certa più prossimo	50
Individuazione di aree di intervento prioritario	52
WP5: Analisi della presenza di infezioni fungine in popolazioni selezionate.....	56
WP6: Linee guida per la gestione di <i>Procambarus clarkii</i> in Sicilia.....	58
Normativa vigente.....	58
Sorveglianza e monitoraggio	59
Gestione	59
Piano di controllo/eradicazione di <i>P. clarkii</i> in Sicilia	60
Azioni informative e divulgative	62
WP7: Valorizzazione come risorsa alimentare e per l'integrazione in prodotti biotecnologici	64
WP7.1 Analisi per la determinazione della qualità delle carni	67
WP7.1a: Analisi per valutare la qualità delle carni e determinazione delle componenti nutrizionali	67



WP7.1b: Analisi per la presenza di contaminanti	70
WP7.2 Analisi per l'utilizzazione in prodotti biotecnologici	98
WP7.2a Messa a punto di protocolli per la produzione di farine alimentari	98
WP7.2b. Messa a punto di protocolli per l'estrazione di molecole bioattive - Chitosano	99
WP7.2b. Messa a punto di protocolli per l'estrazione di molecole bioattive - Astaxantina ...	105
WP7.2c Valutazione delle attività biologiche e dell'utilizzazione dei rispettivi composti isolati.....	107
WP8: Attività di divulgazione.....	111
Bibliografia	112
Allegato 1	123
Allegato 2.....	124
Allegato 3.....	125
Materiali supplementari del WP7	126

Introduzione

Procambarus clarkii, comunemente noto come gambero rosso della Luisiana è una specie di gambero d'acqua dolce di particolare interesse a livello ecologico/ambientale e alimentare. È una specie aliena altamente invasiva, originaria degli Stati Uniti centro-meridionali. A causa della prelibatezza delle sue carni, delle discrete dimensioni che è in grado di raggiungere, della velocità di accrescimento e della sua prolificità, questa specie è tra le più diffuse negli impianti di acquacoltura di numerosi paesi (Gherardi et al., 2014). *P. clarkii* è onnivoro e molto vorace, si nutre principalmente di uova e larve di pesci, anfibi e insetti acquatici. La sua diffusione provoca un significativo danno per il delicato equilibrio degli ecosistemi delle nostre acque interne (Gherardi et al., 2014). In Sicilia la presenza di questo gambero è stata segnalata sin dai primi anni duemila (D'Angelo & Lo Valvo, 2003) e i tentativi di eradicazione che sono stati messi in atto fino ad oggi non hanno dato risultati soddisfacenti (D'Angelo et al., 2008). *Procambarus clarkii* rappresenta una gravissima minaccia per il biota autoctono in quanto, oltre a competere dal punto di vista ecologico con i decapodi autoctoni e oltre a predare invertebrati e stadi larvali di vertebrati degli ecosistemi colonizzati, è portatore sano della peste del gambero dovuta al fungo *Aphanomyces astaci* (Marino et al., 2014; Vecchioni et al., 2022) e, probabilmente, della batracochitridiomicosi. Entrambe queste infezioni sono note per avere effetti gravissimi sulle comunità autoctone. Per tali ragioni è estremamente importante effettuare tempestivamente l'eradicazione locale della specie o, quantomeno, il controllo della sua distribuzione.

La specie

Il gambero rosso della Luisiana, *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), noto anche come gambero killer americano, è un crostaceo dulcacquicolo appartenente all'Ordine dei Decapodi e alla Famiglia dei cambaridi. Gli individui adulti in media sono lunghi sui 15 cm, ma possono raggiungere anche i 20 cm. Presentano una caratteristica colorazione rosso scuro o marrone-rossastro che li rende facilmente distinguibili dalle specie native; sono note anche varietà blu, gialle, bianche e nere, molto apprezzate dagli acquariofili. I giovani hanno, invece, una colorazione grigio-verde con una sottile banda scura su entrambi i lati dell'addome e una più spessa chiara lungo la superficie dorsale. Il cefalotorace è ruvido e, in entrambi i sessi, le chele sono ben sviluppate e granulose, di dimensioni maggiori nei maschi (Gherardi et al. 2014). La specie è originaria degli Stati Uniti centro-meridionali e del Messico nord-orientale, ed è stata ampiamente introdotta in Europa fin dal 1973, specialmente nel centro-sud, e in Italia alla fine degli anni '80 per acquacoltura.

L'habitat elettivo è rappresentato da ambienti lentici, come paludi e acquitrini anche soggetti a forti fluttuazioni stagionali del livello dell'acqua fino al disseccamento temporaneo. È in grado di colonizzare ogni tipo di ambiente acquatico, incluse le acque salmastre e le acque di grotta ed è onnivora e opportunistica (Gherardi et al. 2014). Gli adulti consumano prevalentemente piante e detrito vegetale, i giovani soprattutto proteine animali (Gherardi et al. 2014; Souty-Grosset et al. 2016). Scava attivamente tane, soprattutto nei terreni limo-argillosi, che utilizza per ripararsi dalle condizioni avverse (eccessivo caldo o freddo, disseccamento), per sfuggire ai predatori durante la muta e per la riproduzione (le femmine con le uova rimangono in tana fino alla nascita dei piccoli) (Souty-Grosset et al. 2016). Raggiunge la maturità sessuale a partire dai 45 mm di lunghezza totale, anche entro il primo anno di vita e, in Italia, in alcune zone sono riportati due eventi riproduttivi l'anno. Il numero delle uova prodotte aumenta con la taglia della femmina (fino a 600 uova). Lo sviluppo embrionale e l'accrescimento dipendono dalla temperatura, arrestandosi a temperature inferiori ai 10 °C. Dalle uova nascono piccoli adulti in miniatura. Un individuo in natura vive in media 2 anni (Gherardi et al. 2014; Souty-Grosset et al. 2016). Una volta introdotta in natura, la specie è in grado di diffondersi rapidamente, anche via terra per circa 1 km.

La specie è considerata un ingegnere ecologico, capace di modificare completamente l'ambiente invasivo. Con la sua attività trofica, causa impatti sull'intera comunità, modificando la rete alimentare. Infatti, consuma macrofite e detrito, preda macroinvertebrati, anfibi, uova e avannotti di pesci. L'attività di scavo aumenta la torbidità delle acque, riducendo la penetrazione di luce e la conseguente produttività primaria. Provoca ingenti danni economici per la sua intensa attività di scavo che causa il crollo degli argini (Souty-Grosset et al. 2016). Danneggia, inoltre, alcune aree agricole, in particolare le risaie, per il consumo dei germogli e delle plantule (Souty-Grosset et al. 2016). È vettore di numerose malattie, come la peste del gambero, letale per i decapodi autoctoni, e la chitridiomicosi, letale per gli anfibi nativi (Souty-Grosset et al. 2016). Infine, può causare impatti alla salute umana: è in grado di accumulare metalli pesanti e tossine algali e di trasmettere malattie infettive, come la tularemia; è ospite intermedio di vermi parassiti di vertebrati del genere *Paragonimus*, potenzialmente patogeni per l'uomo e per gli animali da compagnia.

Articolazione del progetto

Alla luce dell'impatto significativo del gambero rosso della Louisiana sugli ecosistemi acquatici siciliani e del suo possibile uso come risorsa, è quindi di primaria importanza la realizzazione di un accurato monitoraggio della presenza, distribuzione e status della specie nelle acque interne regionali, nonché della valutazione del possibile ruolo della specie come vettore di sostanze tossiche

o agenti patogeni in Sicilia. Queste informazioni sono infatti di fondamentale importanza per la stesura di piani di “*best practices*” per la gestione, il controllo e, ove possibile, l’eradicazione della specie. Ciò è in linea con l’art.22 del D.Lgs.230/17, secondo il quale è possibile l’autorizzazione all’uso commerciale di esemplari di specie esotiche invasive di rilevanza unionale o nazionale quale parte delle misure di gestione volte alla loro eradicazione, controllo numerico o contenimento (Reg. UE 1143/14).

Work-packages e voci di spesa

Il progetto è stato articolato nei seguenti *work-packages* (WPs):

- WP1: Aggiornamento delle informazioni distribuzionali della specie in Sicilia
- WP2: Stima della struttura della fenologia di popolazioni selezionate
- WP3: Analisi della struttura genetica dei popolamenti siciliani della specie
- WP4: Individuazione delle aree dove è possibile e prioritario intervenire con azioni di controllo e/o eradicazione
- WP5: Analisi della presenza di infezioni fungine (“peste del gambero”) in popolazioni selezionate
- WP6: Linee guida per la gestione del *Procambarus clarkii* in Sicilia
- WP7: Valorizzazione come risorsa alimentare e per l’integrazione in prodotti biotecnologici
- WP8: Attività di divulgazione

La convenzione ha avuto ufficialmente inizio il 2 febbraio 2023, con la comunicazione di inizio lavori e la richiesta di anticipazione del 40% del budget effettuata dal Dipartimento STEBICEF. Purtroppo, necessità amministrative dell’Ateneo di Palermo hanno poi reso necessaria una rimodulazione del budget e la rinuncia all’anticipazione garantita dall’Assessorato, sostituita da un anticipo di cassa del 50% dell’importo totale garantita dall’Ateneo di Palermo e autorizzata dal Consiglio di Amministrazione dello stesso in data 12 aprile 2023. Di conseguenza, le attività progettuali pianificate per lo svolgimento nel progetto sono state necessariamente comprese in funzione della disponibilità dei fondi.

A partire da questa data sono state avviate le procedure per la messa a bando dei contratti di prestazione occasionale legati allo svolgimento delle attività di campo e di laboratorio nonché all’acquisizione di beni e servizi necessari allo svolgimento del progetto, così come riassunto qui di seguito sulla base delle diverse macrovoci di spesa elencate nel budget.

Voce di spesa: *PERSONALE*

Sono stati emanati i bandi, espletate le selezioni e assegnati gli incarichi, con relativo impegno di spesa, come previsto dal piano di spesa della convenzione. In particolare, sono stati conferiti i seguenti incarichi:

- “Supporto logistico in Sicilia orientale, con particolare riguardo alla stabulazione dei *P. clarkii* raccolti. Campionamento periodico di *P. clarkii* in località selezionate della Sicilia orientale” (pubblicazione 1942 del 25/05/2023 – 1 incarico)
- “Raccolta campioni di eDNA in 70 corpi idrici siciliani e relativo filtraggio dei campioni raccolti. Trappolaggio su base mensile di *P. clarkii* in località selezionate” (pubblicazione 1943 del 25/05/2023 – 3 incarichi)
- “Trappolaggio di *Procambarus clarkii* in località selezionate” (pubblicazione 1944 del 25/05/2023 – 1 incarico)
- “Campionamento di *P. clarkii* in siti selezionati. Valutazione dell’impatto della presenza di *P. clarkii* sul biota autoctono delle acque interne” (pubblicazione 1945 del 25/05/2023 – 1 incarico)
- “Analisi GIS e restituzione cartografica dei risultati conseguiti nell’ambito del monitoraggio del Gambero rosso della Luisiana e della peste del gambero” (pubblicazione 1967 del 26/05/2023 – 1 incarico)
- “Supporto stesura piano di controllo\eradicazione di *P. clarkii* in Sicilia e di testi sul tema delle specie aliene e invasioni biologiche nelle acque interne” (pubblicazione 1968 del 26/05/2023 – 1 incarico)
- “Raccolta campioni di eDNA in 70 corpi idrici siciliani e relativo filtraggio dei campioni raccolti. Campionamento su base mensile di *P. clarkii* in località selezionate. Supervisione e coordinamento delle attività di campionamento” (pubblicazione 1969 del 26/05/2023 – 1 incarico)
- “Estrazione e caratterizzazione molecole bioattive” (pubblicazione 2081 del 07/06/2023 – 1 incarico)

Voce di spesa: *MATERIALE DI CONSUMO E SERVIZI ESTERNI*

In aggiunta ai nove contratti elencati nella voce “Personale”, è stato posto in essere un ulteriore incarico di collaborazione per il ruolo di “Monitoring manager” (pubblicazione 2613 del 26/07/2023 – 1 incarico).

Sulla stessa voce di spesa hanno gravato l’acquisto di filtri (Ditta Merck) e kit e reagenti per l’estrazione del DNA (Ditta AUROGENE; Ditta BIORON) utili nell’ambito del processo di estrazione del DNA ambientale.

Sempre allo stesso fine si è ricorso ai servizi di sequenziamento NGS e Sanger forniti dalla University of Georgia, USA (UGA), MACROGEN Italia e MACROGEN Europe. I servizi esterni per attività di analisi chimico-fisica su campioni di acque superficiali, sedimenti e alimenti (gambero liofilizzato) sono stati commissionati alla ditta C.A.D.A s.n.c. di Filippo Giglio & C.

Si è inoltre proceduto all'acquisto delle nasse a doppio inganno necessarie nell'ambito dello svolgimento delle attività di campo (Ditta ARMFISH di Bellini Stefano).

Su questa voce di spesa ha gravato anche l'acquisto dei roll up e dei materiali che verranno distribuiti in occasione dell'evento di chiusura del progetto (borse di tela, bloc notes, penne con il logo del progetto), realizzati dalla ditta DA.MI.RA. di Luigi Giordano & C. s.n.c.

Sono stati inoltre acquistati reagenti, vetreria, plasticheria e materiale consumabile vario (Ditta ECOSISTEMI SERVICE di Follari Antonio s.a.s.).

Voce di spesa: ACQUISTO ATTREZZATURE

Su questa voce di spesa si è proceduto all'acquisto di due computer fissi dotati di gruppo di continuità (AD Partners) e di uno stereomicroscopio LEICA dotato di sistema di acquisizione ed elaborazioni immagini (LEICA MICROSYSTEMS).

La ditta ECOSISTEMI SERVICE s.a.s. ha inoltre fornito i seguenti strumenti: stufa "TCF 400 PLUS 400". pHmetro "pH 80 PRO STIRRER", congelatore a pozzetto, forno a microonde "Toshiba MW2-MM20P", struttura porta-pipette, pipette di precisione da biologia molecolare "PIPETMAN", MiniAmpT Plus Thermal Cycler, spettrofotometro "Nanoready Touch FC-2100".

Voce di spesa: MISSIONI E ALTRE SPESE

All'interno della voce di spesa "missioni e altre spese" sono andate a gravare i rimborsi per le missioni effettuate, la partecipazione all'82° Congresso dell'Unione Zoologica Italiana, e le spese generali e amministrative.

RISULTATI CONSEGUITI

WP1: Aggiornamento delle informazioni distribuzionali della specie in Sicilia

In accordo alla convenzione in essere, l'aggiornamento delle informazioni distribuzionali sulla specie in Sicilia è stato effettuato attraverso l'implementazione di tre approcci complementari:

1. In primo luogo, è stata realizzata la raccolta delle informazioni disponibili in letteratura, inclusa la letteratura grigia, sui social networks, e tramite progetti di *Citizen science*. Tutte le segnalazioni raccolte sono state verificate sul campo per testare la effettiva presenza di un popolamento vitale della specie nei siti menzionati.
2. A partire dalla carta di distribuzione ottenuta sulla base della ricerca bibliografica, è stato realizzato un progetto di censimento su scala regionale basato sulla ricerca e cattura degli individui attraverso osservazioni dirette di segni di presenza della specie e l'uso di nasse innescate. Le prospezioni e le attività di trappolamento sono state realizzate al fine di avere una copertura rappresentativa dei corpi idrici d'acqua dolce presenti nei principali bacini idrografici siciliani.
3. Nel caso di bacini di dimensioni tali da rendere poco rappresentativo il censimento tramite sessioni di trappolamento e ricerca attiva, è stata indagata la possibile presenza della specie tramite analisi del DNA ambientale (*eDNA*). Tramite metodiche di sequenziamento di nuova generazione (denominata *Next Generation Sequencing* - NGS), partendo da un campione d'acqua contenente numerosi frammenti di DNA, è tecnicamente possibile risalire alle specie dalle quali derivano tali frammenti, e quindi ai popolamenti dei bacini indagati.

Di seguito viene riportato l'esito dei lavori della WP1 separatamente per ognuno dei tre approcci impiegati.

WP1.1 Raccolta e analisi delle informazioni bibliografiche e Citizen science

La ricerca di informazioni pregresse sul Gambero rosso della Luisiana è stata un irrinunciabile punto di partenza per la pianificazione del monitoraggio di campo. Le informazioni già acquisite sulla presenza della specie in Sicilia necessitano infatti di conferma e monitoraggio ed è, inoltre, altrettanto importante una verifica sulle aree circostanti o connesse (ad es. lungo aste fluviali o in aree caratterizzate da un'elevata densità di stagni) per accertare l'eventuale espansione della specie a partire dalle aree "sorgente" in cui è stata introdotta.

La letteratura scientifica in questi casi rappresenta il più affidabile punto di partenza ma, sul piano dell'individuazione dei nuovi siti, il monitoraggio dei *social media* è una valida attività integrativa per incrementare le conoscenze su questa specie.

WP1.1a Review della letteratura scientifica esistente su *Procambarus clarkii* in Sicilia

È di seguito riportata in ordine cronologico la letteratura sulla presenza del Gambero rosso della Luisiana in Sicilia. Ad ogni titolo sono associati i siti per cui è stata contestualmente descritta la presenza di questa specie.

1) D'Angelo, S.; Lo Valvo, M. 2003. On the presence of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Sicily. *Nat. Sicil.*, 27, 325–327.

Siti inediti riportati:

- Gorgo Basso, RNI “Lago Preola e Gorgi Tondi” 37.609080 N, 12.655051 E – Provincia di Trapani

2) Di Leo, C.; Faraone, F.P.; Lo Valvo, M. 2014. A new record of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea, Cambaridae), in Sicily, Italy. *Biodivers. J.* 2014, 5, 425–428.

Siti inediti riportati:

- Lago Rosamarina 37.938619 N, 13.635133 E – Provincia di Palermo

3) Bellante, A.; Maccarone, V.; Buscaino, G.; Buffa, G.; Filiciotto, F.; Traina, A.; Del Core, M.; Mazzola, S.; Sprovieri, M. 2015. Trace element concentrations in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and surface sediments in Lake Preola and Gorgi Tondi natural reserve, SW Sicily. *Environ. Monit. Assess.*, 187, 404.

Siti inediti riportati:

- Lago Preola, RNI “Lago Preola e Gorgi Tondi” 37.609080 N, 12.655051 E – Provincia di Trapani
- Gorgo Medio, RNI “Lago Preola e Gorgi Tondi” 37.611327 N, 12.651033 E – Provincia di Trapani

4) Maccarrone, V.; Filiciotto, F.; Buffa, G.; Di Stefano, V.; Quinci, E.M.; de Vincenzi, G.; Mazzola, S.; Buscaino, G. 2016. An invasive species in a protected area of Southern Italy: The structure, dynamics and spatial distribution of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, 16, 401–412.

Siti inediti riportati:

- Gorgo Alto, RNI “Lago Preola e Gorgi Tondi” 37.612475 N, 12.649554 E – Provincia di Trapani

5) Faraone, F.P.; Giacalone, G.; Canale, D.E.; D'Angelo, S.; Favaccio, G.; Garozzo, V.; Giancontieri, G.L.; Isgrò, C.; Melfi, R.; Morello, B.; et al. 2017. Tracking the invasion of the red swamp crayfish

Procambarus clarkii (Girard, 1852) (Decapoda Cambaridae) in Sicily: A “citizen science” approach. *Biogeographia*, 32, 25–29.

Siti inediti riportati:

- Canale Buttaceto 37.437703 N, 15.047918 E – Provincia di Catania
- Pantani di Venetico 38.212611 N, 15.364333 E – Provincia di Messina
- Fiume Irminio 36.996840 N, 14.778049 E – Provincia di Ragusa
- Fiume San Leonardo 37.343166 N, 15.088748 E – Provincia di Catania
- Lago di Murana 37.626475 N, 12.634279 E – Provincia di Trapani

6) Deidun, A.; Sciberras, A.; Formosa, J.; Zava, B.; Insacco, G.; Corsini-Foka, M.; Crandall, K.A. 2018. Invasion by non-indigenous freshwater decapods of Malta and Sicily, central Mediterranean Sea. *J. Crustac. Biol.*, 38, 748–753.

Siti inediti riportati:

- Fiume Gornalunga 37.388865 N, 15.078404 E – Provincia di Catania
- Foce Fiume Simeto 37.400072 N, 15.064382 E – Provincia di Catania
- Venetico, pozze artificiali 38.195686 N, 15.384248 E – Provincia di Messina
- Lago Santa Rosalia 36.974803 N, 14.776731 E – Provincia di Ragusa
- Torrente Costanzo 37.252467 N, 14.912453 E – Provincia di Siracusa
- Torrente Margi 37.214115 N, 14.891158 E – Provincia di Siracusa

7) Vecchioni, L.; Faraone, F.P.; Stoch, F.; Arculeo, M.; Marrone, F. 2022. Diversity and Distribution of the Inland Water Decapods in Sicily (Crustacea, Malacostraca). *Diversity* 14 (4), 246.

Siti inediti riportati:

- Fiume San Leonardo 37.842270 N, 13.562021 E – Provincia di Palermo
- Lentini, canale 37.282435 N, 14.970489 E – Provincia di Siracusa
- Lentini, stagno agricolo 37.360270 N, 14.913601 E – Provincia di Siracusa

I 20 siti estrapolati dalla letteratura scientifica sono riassunti nella seguente tabella sinottica, dove sono riportate la provincia d'appartenenza, il nome del sito, le coordinate in gradi decimali, l'anno di pubblicazione e il riferimento bibliografico, indicato con un numero riferito all'elenco delle pubblicazioni che precede questa sezione:

Provincia	Sito	Coord. N	Coord. E	Anno	Rif. Bibliografico
Catania	Canale Buttaceto	37.437703	15.047918	2017	5
Catania	Fiume Gornalunga	37.388865	15.078404	2018	6
Catania	Foce Fiume Simeto	37.400072	15.064382	2018	6
Messina	Pantani di Venetico	38.212611	15.364333	2017	5
Messina	Venetico, pozze artificiali	38.195686	15.384248	2018	6
Palermo	Fiume San Leonardo	37.842270	13.562021	2022	7
Palermo	Lago Rosamarina	37.938619	13.635133	2014	2
Ragusa	Fiume Irminio	36.996840	14.778049	2017	5
Ragusa	Lago Santa Rosalia	36.974803	14.776731	2018	6

Provincia	Sito	Coord. N	Coord. E	Anno	Rif. Bibliografico
Catania	Fiume San Leonardo	37.343166	15.088748	2017	5
Siracusa	Lentini, canale	37.282435	14.970489	2022	7
Siracusa	Lentini, stagno agricolo	37.360270	14.913601	2022	7
Siracusa	Torrente Costanzo	37.252467	14.912453	2018	6
Siracusa	Torrente Margi	37.214115	14.891158	2018	6
Trapani	Lago di Murana	37.626475	12.634279	2017	5
Trapani	Lago Preola	37.620374	12.641136	2015	3
Trapani	Gorgo Medio	37.611327	12.651033	2015	3
Trapani	Gorgo Basso	37.609080	12.655051	2002	1
Trapani	Gorgo Alto	37.612475	12.649554	2016	4

WP1.1b Ricerca nei *social media*

La ricerca nei *social media* è condotta monitorando i seguenti gruppi, gestiti da alcuni dei partecipanti al progetto:

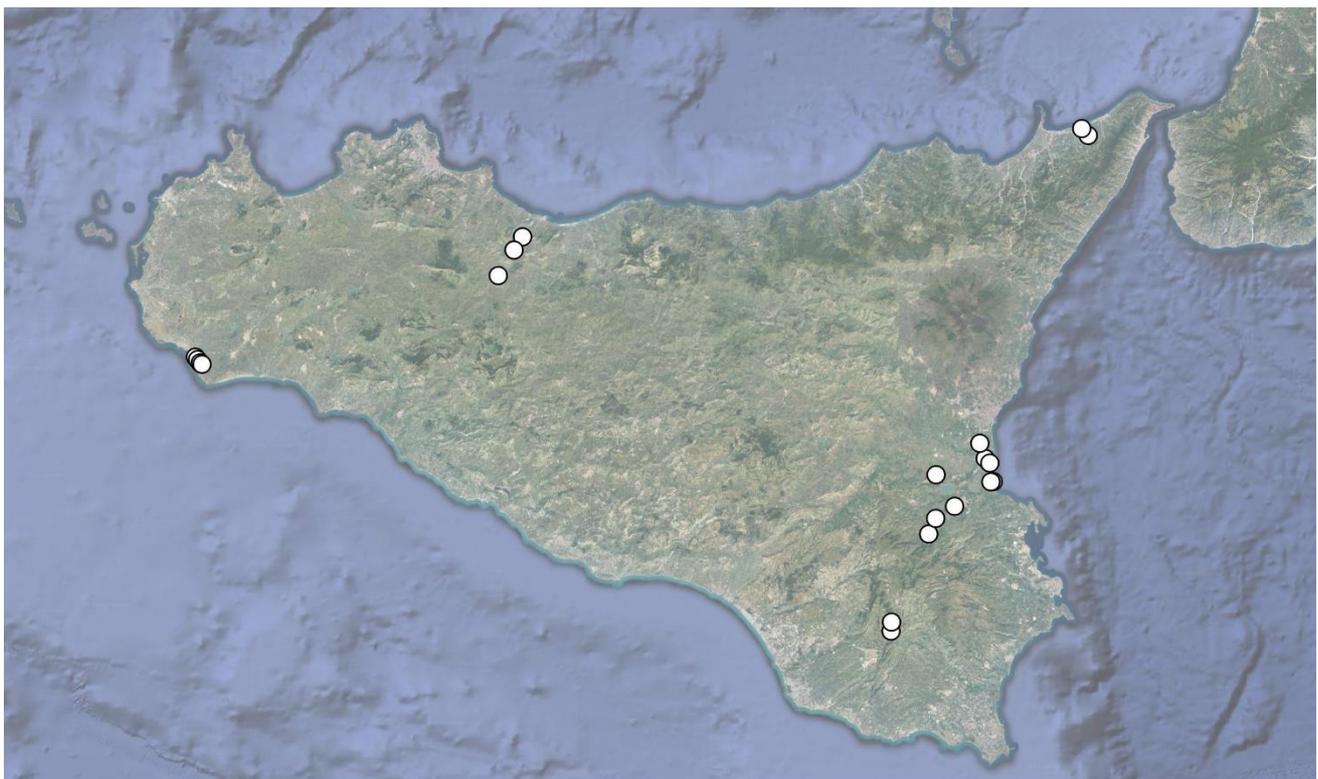
- **Fauna Siciliana** (<https://www.facebook.com/groups/280292208752800>) – gruppo ad alta valenza sulla fauna terrestre e dulciacquicola del territorio siciliano che conta attualmente più di 21.000 iscritti ed una costante partecipazione degli utenti. Tale gruppo, come altri con le stesse caratteristiche, per la sua ampia partecipazione e per la folta presenza di zoologi specialisti è stato utile all'individuazione di varie specie nuove per la Sicilia o per l'Italia e per il miglioramento della conoscenza della distribuzione di varie specie rare, localizzate o aliene. Varie osservazioni su *Procambarus clarkii* originariamente pubblicate su Fauna Siciliana sono state incluse in alcune delle pubblicazioni riportate nel paragrafo precedente

- ***Procambarus clarkii* in Sicilia** (<https://www.facebook.com/groups/118298848647315>) – gruppo fondato nel 2016 con lo specifico obiettivo di raccogliere osservazioni sulla presenza di nuclei introdotti di Gambero rosso della Luisiana in Sicilia. Alcune osservazioni contenute in Faraone et al. (2017) derivano dalle attività contenute in questo gruppo.

Dall'inizio dei lavori del progetto nessuna osservazione di *Procambarus clarkii* in località inedite è emersa da queste fonti benché siano state pubblicate alcune foto a conferma della presenza della specie per siti già noti.

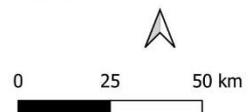
Altre fonti dalla rete sono state consultate periodicamente, come ad esempio **iNaturalist** (<https://www.inaturalist.org/>), un *social network* americano senza scopo di lucro di naturalisti,

appassionati e biologi costruito sul concetto di mappatura e condivisione di osservazioni sulla biodiversità in tutto il mondo. Un'altra risorsa monitorata è stata in fine il Forum Naturalistico **Natura Mediterraneo** (<https://www.naturamediterraneo.com/>), che conta oltre 17.000 iscritti e si dipana in vari forum tematici che riguardano molte categorie tassonomiche e anche una sezione focalizzata sulle specie aliene.



Gambero della Louisiana
(*Procambarus clarkii*)

○ Siti di presenza nota o presunta



Rappresentazione cartografica dei siti di presenza nota o presunta a seguito dell'analisi preliminare delle informazioni disponibili nella bibliografia scientifica e in fonti non ufficiali.

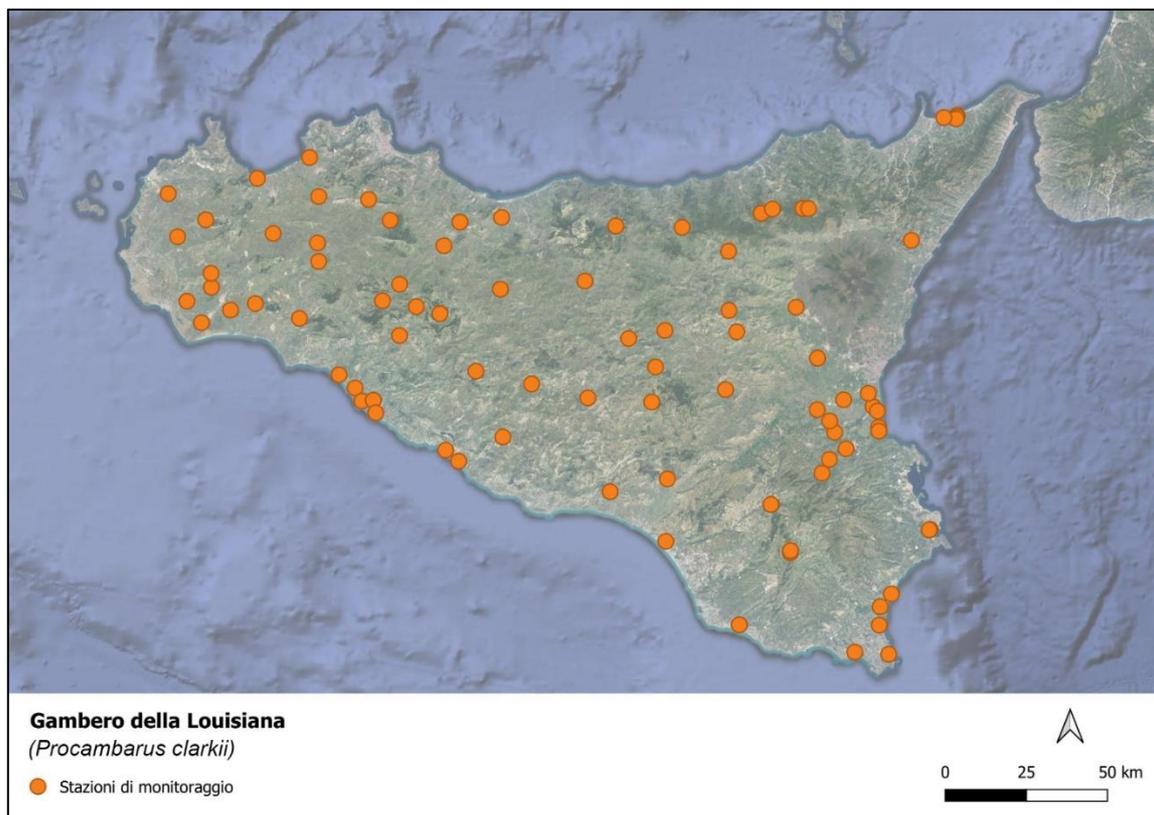
WP1.2 Aggiornamento delle informazioni distribuzionali della specie in Sicilia

WP1.2a Censimento tramite ricerca di segni di presenza e cattura

Sulla base di quanto emerso dall'analisi bibliografica e dalla ricerca di informazioni non ufficiali, è stato realizzato un piano di monitoraggio, individuando sia le aree che necessitano di conferma della presenza del gambero rosso della Louisiana, sia aree dove la specie non era nota, in modo da garantire una copertura quanto più omogenea possibile del territorio.

Le aree monitorate sono state individuate tenendo conto dell'omogeneità di distribuzione sul territorio regionale e della presenza di corpi idrici potenzialmente idonei alla colonizzazione della specie in esame. Nel complesso, in prima analisi sono stati individuati 88 siti di monitoraggio. Di questi ne sono stati esclusi dieci in corso di progetto per effettiva scarsa idoneità per la specie o per via della loro inaccessibilità ai campionatori.

Prima dell'inizio dei campionamenti è stata inviata una comunicazione ufficiale tramite PEC agli Enti provinciali preposti al controllo della attività di pesca nelle acque interne siciliane, e a seguire, una richiesta di accesso e di autorizzazione al campionamento indirizzata agli Enti Gestori delle aree protette all'interno delle quali ricadono i siti di monitoraggio nonché, ove necessario, agli enti pubblici o privati che ne gestiscano l'accesso



Rappresentazione cartografica dei siti di monitoraggio individuati tenendo conto del criterio di omogeneità rispetto al territorio regionale e della presenza di siti potenzialmente idonei alla colonizzazione della specie in esame.

Coerentemente con quanto previsto dal “Piano di Gestione nazionale del gambero rosso della Luisiana (*Procambarus clarkii*)”, il monitoraggio della specie è stato effettuato attraverso la ricerca di segni di presenza (tane e resti di individui) e mediante l'utilizzo di nasse a doppio inganno, di forma cilindrica, aventi lunghezza di cm 60-90 cm e diametro di 30-40 cm, e innescate con esca

trofica (generalmente una semplice scatoletta di cibo per gatti opportunamente forata). Di particolare comodità risultano le nasse costruite su una molla metallica e quindi facilmente richiudibili per agevolare il trasporto. Tale attrezzatura è stata acquistata con fondi specifici del progetto. Le nasse sono state collocate lungo le sponde del corpo idrico ad una certa distanza l'una dall'altra e lasciate semisommerse per evitare l'annegamento di esemplari di eventuali specie *non-target* che possono entrare attratte dall'esca (anfibi, rettili e piccoli mammiferi, talvolta anche uccelli). Le specie *non-target* sono sempre state annotate e rilasciate *in loco*.



Posizionamento in campo delle nasse di cattura (Fiume San Leonardo)



Nasse dopo la sessione di cattura (risaie di Cuccumella)



Ritrovamento di segni di presenza (risaie di Cuccumella)

In fase di progetto sono stati campionati 78 siti, permettendo di individuare con certezza 5 nuovi siti di presenza della specie aliena invasiva (Lago di Villarosa, Fiume Tellaro, Fiume Asinaro, Lago Poma, Lago Olivo) e confermarne la presenza in gran parte dei siti in cui era già noto.

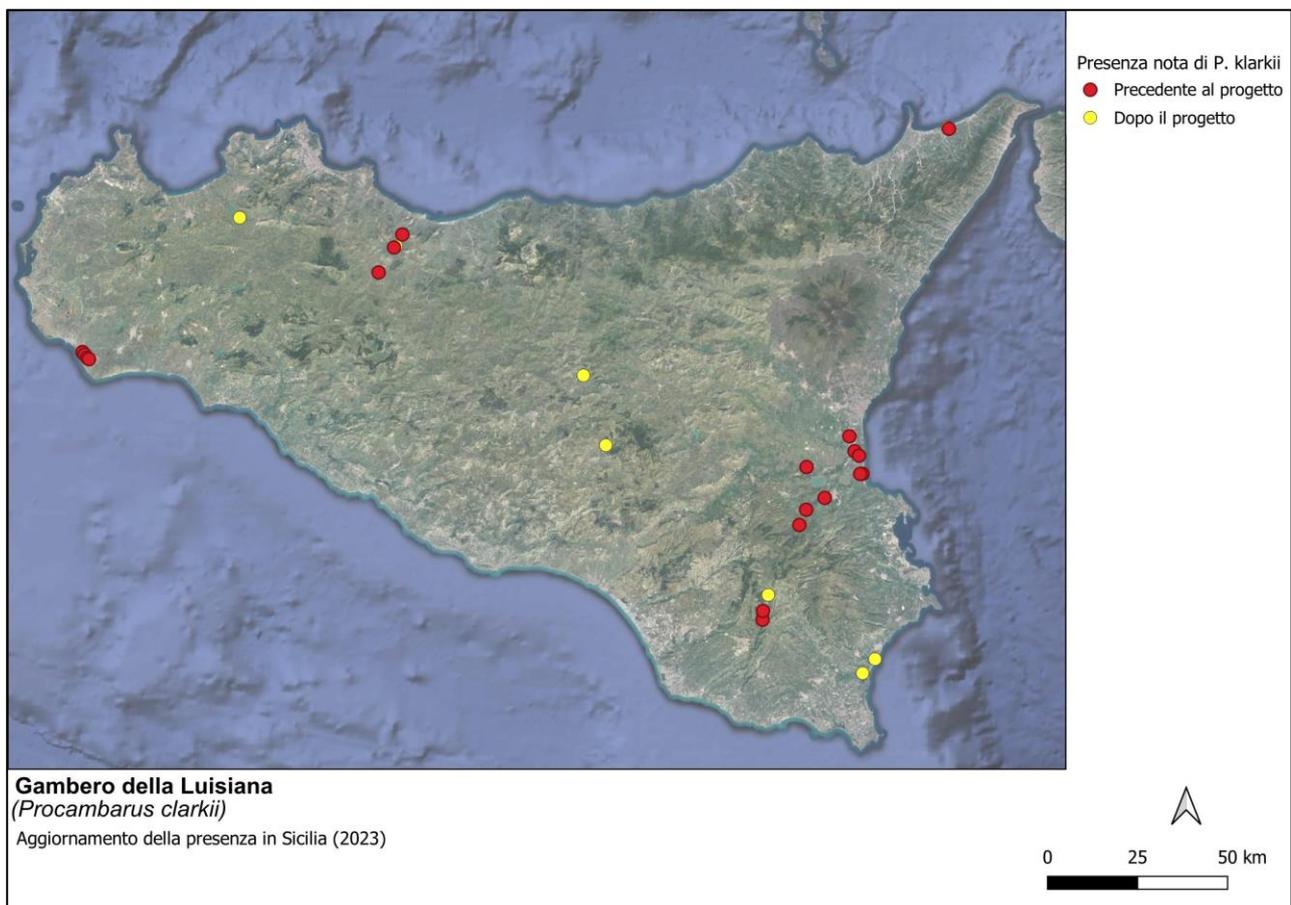
Alla conclusione del progetto il gambero rosso della Luisiana risulta sicuramente presente nei seguenti siti:

1. Sistema lacustre del Lago Preola e Gorgi Tondi. È il primo sito per il quale è stata segnalata la presenza della specie aliena invasiva (presenza pregressa ai risultati di progetto), che appare localmente piuttosto abbondante. Si tratta degli ambienti umidi ricadenti all'interno della Riserva Naturale "Lago Preola e Gorgi Tondi", gestita dal WWF. L'area è inclusa nei siti Natura 2000 ITA010005 "Laghetti di Preola e Gorgi Tondi, Sciare di Mazara" e ITA010031 "Laghetti di Preola e Gorgi Tondi, Sciare di Mazara e Pantano Leone". Sono individuati per i siti gli habitat di importanza unionale 3140 e 3150.
2. Lago Poma. Si tratta di uno dei grandi bacini artificiali della provincia di Palermo. La presenza del gambero rosso della Luisiana non era nota per questo sito prima del progetto (nuova segnalazione). L'invaso non ricade all'interno di aree protette. Lungo le sponde

- meridionali dell'invaso è segnalato l'habitat 92A0. Lo specchio d'acqua dista circa 2,5 km dal sito Natura 2000 ITA020030 "Monte Matassaro, Monte radara e Monte Signora".
3. Lago Rosamaria e Fiume San Leonardo. La presenza in questo complesso acquatico, localmente abbondante, era nota prima dell'inizio del presente progetto (presenza pregressa ai risultati del progetto). Parte del Fiume San Leonardo, interessato dalla presenza della specie aliena, ricade all'interno della ZSC "Rocche di Ciminna" (ITA020024). Sono presenti gli habitat 92D0, 3250, 3290. Nelle immediate vicinanze insiste la Riserva Naturale "Serre di Ciminna".
 4. Lago di Villarosa. Si tratta di un invaso artificiale di grandi dimensioni della provincia di Enna. La presenza del gambero rosso della Luisiana non era nota prima del progetto (nuova segnalazione). L'invaso non ricade all'interno di aree protette e siti Natura 2000. È presente l'habitat 92D0 lungo i corsi d'acqua che alimentano il bacino e lungo l'effluente Fiume Morello.
 5. Lago Olivo. Si tratta di un invaso artificiali di grandi dimensioni della provincia di Enna. La presenza del gambero rosso della Luisiana non era nota per questo sito prima del progetto (nuova segnalazione). L'invaso ricade interamente all'interno della ZSC "Boschi di Piazza Armerina" (ITA060012) e nelle immediate vicinanze sono segnalati gli habitat 92D0 e 3290.
 6. Stagni di Venetico. Si tratta di un sistema di stagni che ricadono nella zona industriale di Venetico, in provincia di Messina. L'area non ricade all'interno di aree protette e non sono presenti habitat di interesse unionale. Nelle vicinanze, a meno di un chilometro, sono presenti lembi di habitat 3290, in corrispondenza delle foci di piccoli corsi d'acqua. In bibliografia è noto un altro sito di presenza nelle prossimità, Venetico Superiore, la cui ricognizione non ha consentito di individuare alcun ambiente acquatico idoneo alla presenza del gambero rosso della Luisiana, facendo propendere ad un errore di coordinate/localizzazione della bibliografia di riferimento (Deidun et al. 2018)
 7. Stagni delle risaie di Cuccumella. Si tratta di un insieme di stagni agricoli a scopo irriguo in comune di Lentini. La presenza del gambero rosso della Luisiana, che risulta localmente abbondante, era nota prima del presente progetto. Il sito non ricade all'interno di aree protette e non sono presenti nelle immediate vicinanze habitat di interesse unionale. Il sito è tuttavia prossimo al Lago Biviere di Lentini (circa 3 km), in possibile continuità con esso attraverso altri stagni agricoli presenti. Il lago ricade all'interno della ZPS ITA070029 "Biviere di Lentini" interessata dalla presenza dell'habitat 3150. Le acque del Biviere sono state monitorate durante il progetto, con esito negativo; tuttavia, appare assai probabile che la

- specie possa colonizzare le sue acque in breve tempo, se ciò non è già avvenuto ma con densità ancora basse. Se ne rende pertanto necessario il monitoraggio attento e continuo.
8. Foce del Fiume Simeto e Lago Gornalunga. In questa sede le aree ricadenti nel sistema idrico della foce del Fiume Simeto e del Lago Gornalunga vengono trattate unitamente riconoscendone una decisa continuità ambientale. La presenza in quest'ambito è nota da prima del progetto (presenza pregressa) e viene confermata. L'area appare ecologicamente vulnerabile, essendo inclusa all'interno della Riserva Naturale Oasi del Simeto, della ZSC ITA070001 e della ZPS ITA070029, e includendo gli habitat acquatici di interesse unionale 3280 e 92D0. La possibile diffusione della specie aliena invasiva lungo l'asse dei fiumi Simeto, Gornalunga e Dittaino deve essere attentamente monitorata. A tal riguardo e da segnalare che all'altezza dello sbarramento di Ponte Barca sul fiume Simeto, in fase di progetto non è stata rinvenuta la specie.
 9. Torrente San Leonardo. Il torrente si trova nella piana di Catania, effluente principale del Lago Biviere di Lentini di cui si è già parlato in precedenza. L'area si trova non troppo distante dalla foce del fiume Simeto e dal Lago Gornalunga (circa 5 km), già trattati al punto precedente. Anche in questo caso si tratta di una località di presenza già nota prima dell'inizio del progetto. Pur trovandosi esternamente alla Riserva Naturale Oasi del Simeto, è incluso nella medesima ZPS (ITA070029). Il tratto di fiume in cui è stata rinvenuta la specie aliena invasiva è interessato dalla presenza di habitat 3280.
 10. Torrente Asinaro. Il torrente, e il sito di rinvenimento del gambero rosso della Luisiana, si trovano in prossimità di Calabernardo, frazione costiera di Noto (SR). La presenza della specie aliena invasiva non era nota per questo sito prima del progetto (nuova segnalazione). Il sito non ricade all'interno di aree protette e non sono individuati habitat di interesse comunitario nelle immediate vicinanze. A monte del luogo di ritrovamento (circa 5 km), sullo stesso corso d'acqua, è segnalata la presenza di habitat 92A0.
 11. Fiume Tellaro. Si tratta di un corso d'acqua che sfocia in mare all'interno della Riserva Naturale di Vendicari. Il ritrovamento, avvenuto immediatamente al di fuori della riserva, è inedito (nuova segnalazione). La presenza della specie aliena invasiva è certamente da attribuire anche all'interno della riserva, che ricade interamente all'interno della ZSC "Vendicari" (ITA090002). Si rinvenivano porzioni di habitat 92D0.
 12. Fiume Irmínio e Lago Santa Rosalia. Il Lago Santa Rosalia è un invaso artificiale tra Ragusa e Giarratana, lungo il fiume Irmínio (provincia di Ragusa). Sia il lago, sia il tratto del fiume a monte di esso, mostrano la presenza del gambero rosso della Luisiana, presenza già nota

prima del progetto. Il lago, e buona parte del fiume, rientrano all'interno della ZSC "Alto corso del Fiume Irminio" (ITA080002) dove si rinvennero habitat 92D0. Nonostante i campionamenti effettuati il progetto non ha permesso di individuare la presenza della specie aliena invasiva lungo il fiume Irminio a sud del Lago Santa Rosalia. Si ritiene importante monitorare attentamente anche questo tratto che presenta pregevoli contesi ambientali, oltre all'area di foce interessata dalla Riserva Naturale "Macchia Foresta del Fiume Irminio".



Rappresentazione cartografica dell'aggiornamento della distribuzione nota di Procambarus clarkii in Sicilia.

Nella pagina seguente si riporta in forma tabellare l'elenco dei siti monitorati. La tabella riporta gli esiti dei campionamenti e le specie non target rinvenute in fase di monitoraggio.

Località	Provincia	Tipologia	P. clarkii	Note	Altre specie
Invaso Baiata	TP	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Diga Zaffarana	TP	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Lago Rubino	TP	Invaso artificiale (diga)	NO		Perca fluviatilis, Ameiurus melas, Cyprinus carpio
Stagni Vignale	TP	Stagno	NO		nr
Pantano Leone	TP	Stagno	NO	In asciutta	nr
F. San Bartolomeo	TP	Fiume	NO		nr
Stagni Gallitello	PA	Stagni	NO		Emys trinacris
Lago Trinità	TP	Invaso artificiale (diga)	NO		Potamon fluviatile, 6 Emys trinacris, Amerius melas
Laghetto Aquilotta	TP	Laghetto	NO		Emys trinacris
F. Modione	TP	Fiume	NO		nr
F. Belice	TP	Fiume	NO		nr
F. Nocella	PA	Fiume	NO		Potamon fluviatile, Pelophylax spp.
L. Poma	PA	Invaso artificiale (diga)	SI	NUOVA SEGNALAZIONE	nr
L. di Piana	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Ponte Calatrasi (Belice Dx)	PA	Fiume	NO		nr
L. Garcia	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		Atherina sp., Potamon fluviatile
L. Arancio	AG	Invaso artificiale (diga)	NO		Atherina sp.
F. Verdura	AG	Fiume	NO		Potamon fluviatile
F. Magazzolo	AG	Fiume	NO		nr
F. Platani (foce)	AG	Fiume	NO		Callinectes sapidus
L. Scanzano	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
F. San Leonardo	PA	Fiume	SI	Presenza pregressa	nr
L. di Prizzi	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
L. Gammauta	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		Natrix helvetica, Cyprinus carpio
L. Piano Leone	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		Pelophylax spp.
L. Fanaco	PA	Invaso artificiale (diga)	NO		Ameiurus melas
L. Magazzolo	AG	Invaso artificiale (diga)	NO		Emys trinacris
Laghetto Gorgo	AG	Laghetto	NO		nr
F. di Torre Salsa	AG	Fiume	NO	In asciutta	nr
F. San Leone	AG	Fiume	NO		Emys trinacris
L. Rosamarina	PA	Invaso artificiale (diga)	SI	Presenza pregressa	Emys trinacris, Potamon fluviatile, Natrix helvetica, Pelophilax spp.
Stagni Sciarra	PA	Stagni agricoli	NO		nr
Laghetto Fontana Murata	PA	Stagni agricoli	NO		Hirudo cfr. verbana
Lago Soprano	CL	Lago naturale	NO	In asciutta	nr
F. Platani (alto)	CL	Fiume	NO		Emys trinacris
L. San Giovanni	AG	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Fiume Naro	AG	Fiume	NO		Emys trinacris
Stagni di Blufi e Imera Meridionale	PA	Stagni e Fiume	NO		Potamon fluviatile, Gambusia affinis
Imera Meridionale	CE/EN	Fiume	NO		nr
Lago Comunelli	CL	Invaso artificiale (diga)	NO	In asciutta	nr
Urio Quattrocchi	ME	Laghetto	NO		Emys trinacris, Tinca tinca
Torrente Pollina	PA	Fiume	NO	In asciutta	nr
L. Nicoletti	EN	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
L. Di Villarosa	EN	Invaso artificiale (diga)	SI	NUOVA SEGNALAZIONE	Potamon fluviatile, Amerius melas
Lago di Pergusa	EN	Lago	NO		nr
Lago Olivo	EN	Invaso artificiale (diga)	SI	NUOVA SEGNALAZIONE	nr
Bacino Cimia	CL	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Biviere di Gela	CL	Lago costiero	NO		nr
L. di Ancipa	EN/ME	Invaso artificiale (diga)	NO		Potamon fluviatile
L. Maulazzo	ME	Lago	NO		Pelophylax spp.
Biviere di Cesarò	ME	Lago	NO		Pelophylax spp, Ameiurus melas
L. Pozzillo	EN	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Risaie di Cuccumella	CT	Stagni agricoli	SI	Presenza pregressa	nr
Lago Sciajuana	EN	Invaso artificiale (diga)	NO		nr
Ara dei Palici	EN	Fiume/Stagno	NO		nr
Fiume Alcantara	CT/ME	Fiume	NO		nr
Stagni Venetico	ME	Stagni	SI	Presenza pregressa	Trachemys scripta scripta
Venetico Superiore	ME	?	NO	Presenza pregressa	Nessun ambiente umido individuato
Torrente Muto	ME	Torrente/Foce	NO		nr
Gorghi Tondi	TP	Laghetto	SI	Presenza pregressa	Emys trinacris
Fiume Dittaino	CT	Fiume	NO		nr
Fiume Gornalunga	CT	Fiume	NO		nr
Biviere di Lentini	SR	Lago	NO		Trachemys scripta
Fiume Reina	CT	Fiume	NO		nr
Fiume Costanzo - sud biviere	CT	Fiume	NO	In asciutta	nr
Fiume Costanzo - nord biviere	CT	Fiume	NO	In asciutta	nr
Lago Santa Rosalia	RG	Invaso artificiale (diga)	SI	Presenza pregressa	nr
Fiume Irmínio (parte alta)	RG	Fiume	SI	Presenza pregressa	Cyprinus carpio, Micropterus salmoides
Pantano Longarini - canale Cerbicanc	SR	Pantano	NO		Mugil cephalus
Fiume Simeto (ponte barca)	CT	Fiume	NO		Cyprinus carpio
Gornalunga lago	CT	Fiume/Lago	SI	Presenza pregressa	nr
Torrente San Leonardo (ss114)	SR	Fiume	SI	Presenza pregressa	Cyprinus carpio
Fiume Anapo trav palma	SR	Fiume	NO		nr
Fiume Ciane	SR	Fiume	NO		nr
Fiume Tellaro - ponte piana banca	SR	Fiume	SI	NUOVA SEGNALAZIONE	Potamon fluviatile, Tinca tinca, Mugil cephalus
Pantano Morghella	SR	Pantano	NO	In asciutta	nr
Fiume Asinaro (calabernardo)	SR	Fiume	SI	NUOVA SEGNALAZIONE	nr
Margi-San Leonardo	SR	Fiume	NO		Potamon fluviatile

WP1.2b Verifica della presenza di *Procambarus clarkii* attraverso l'analisi del DNA ambientale

Al fine di consentire l'accertamento della presenza di *Procambarus clarkii* anche nei siti in cui le sessioni di cattura non hanno dato esito positivo, sono stati raccolti campioni di acqua direttamente in sito, per consentire la successiva analisi del DNA ambientale (eDNA). I campioni di acqua sono stati raccolti presso tutti i siti esaminati.

In particolare, durante le attività di campionamento gli operatori hanno raccolto 2 litri d'acqua da ogni corpo idrico campionato, premurandosi di raccogliere aliquote d'acqua da più punti in ogni bacino, così da poter avere un campione quanto più eterogeneo e rappresentativo possibile. La raccolta d'acqua è stata effettuata utilizzando delle bottiglie in plastica sterili. Ogni bottiglia d'acqua è stata etichettata e mantenuta in freddo fino all'arrivo in laboratorio.

In laboratorio, le singole bottiglie sono state prelevate, ispezionate e processate per il filtraggio finale. Tale filtraggio è stato effettuato tramite l'utilizzo di un sistema composto da una rampa base a 3 posti in cui sono stati allocati, negli appositi alloggi, i filtri Millipore da 0.45 μm (1 filtro per ogni litro d'acqua filtrata). In aggiunta, sopra il filtro è stato posto un bicchiere in acciaio INOX da 500 ml che ha permesso il contenimento dell'acqua da filtrare, il tutto è stato poi bloccato tramite delle apposite pinze di fissaggio. A tale sistema è stata collegata una beuta in vetro per la raccolta dell'acqua filtrata, a cui è stata connessa, tramite dei tubi in gomma, una pompa a membrana da vuoto che ha permesso di effettuare il filtraggio. Attualmente sono stati filtrati 156 L d'acqua da 78 siti di campionamento, per un totale di 156 filtri Millipore (2 filtri per ogni sito campionato).

Una volta effettuata la filtrazione, ogni filtro Millipore è stato processato per l'estrazione del DNA utilizzando il kit d'estrazione della BIORON "Ron's Tissue & Blood DNA Mini Kit", seguendo il protocollo fornito dal produttore a cui è stata apportata una leggera modifica nella quantità del buffer di lisi che è stato triplicato rispetto al protocollo. Questa variazione è stata effettuata al fine di poter estratte con successo il DNA dal filtro stesso. In seguito, il DNA estratto da ogni singolo filtro Millipore è stato inviato alla ditta MACROGEN per poter amplificare, tramite PCR (reazione a catena della polimerasi) un frammento della COI, utilizzando il primer set "fwh2" descritto da Vamos et al. (2017), e successivamente effettuare il sequenziamento massivo NGS. Tuttavia, la MACROGEN ha riscontrato delle criticità nell'amplificazione del frammento del gene mitocondriale richiesto, ottenendo dei risultati particolarmente "sporchi", ovvero ottenendo dei prodotti multipli dal processo di amplificazione. La presenza di prodotti multipli, a seguito della tecnica biomolecolare summenzionata, denota che potenzialmente la coppia di primer utilizzata ha amplificato anche regioni differenti rispetto quella di interesse. Per tale ragione, è stato necessario procedere con delle

ottimizzazioni della PCR, testando diverse condizioni del ciclo termico, ed in particolar modo, impostando differenti temperature di appaiamento dei primers. A seguito di tali ottimizzazioni della PCR, è stato possibile ottenere dei risultati migliori dei precedenti ottenuti, seppur erano ancora presenti dei residui di prodotti multipli. Ciononostante, a seguito di un tavolo tecnico con la MACROGEN si è deciso di procedere con i passaggi successivi del sequenziamento NGS. Pertanto, la ditta in questione ha creato le cosiddette “library” dei nostri campioni per poter poi procedere con il sequenziamento vero e proprio. La creazione delle *libraries* consiste nell’associare ai prodotti PCR degli adattatori che permettano al sequenziatore “Illumina” di ancorare il frammento di DNA amplificato ad una “flow cell”, per poi avviare il successivo sequenziamento NGS tramite la tecnologia della “SBS” (*Sequencing By Synthesis*). Al termine dell’analisi il sequenziatore *Illumina* genera delle immagini “grezze” che vengono analizzate da un software specifico che converte l’immagine della singola lettura (in genere per ogni campione si ottengono migliaia di letture, chiamate con il termine anglosassone “reads”) in un file denominato “FASTAQ” (la profondità di sequenziamento scelta è stata quella standard di 50000-100000 *reads*). A questo punto, si è proceduto con l’analisi bioinformatica (usando la *pipeline* “Qiime2”) che prevede la pulizia delle sequenze di ogni *read* per ogni campione (i.e., rimozione degli adattatori aggiunti durante la preparazione delle *libraries*; esclusione di tutte le chimere, ossia quelle sequenze generate erroneamente dal sequenziamento, etc..). Prendendo ad esempio le *reads* prodotte dal campione “1803” (Gorgo Basso, RNI Oasi WWF Lago Preola e Gorgi Tondi – provincia di Trapani), abbiamo ottenuto dal sequenziamento un totale di 300,554 *reads* che in termini di paia di basi nucleotidiche equivalgono a 90,466,754. Successivamente, utilizzando il software “FASTQC”, abbiamo verificato a livello qualitativo ogni singola *read* ottenuta. Tuttavia, le *reads* analizzate hanno mostrato una ridottissima qualità a partire dalla base 115, molto probabilmente a causa dei residui di prodotti multipli ottenuti in fase di amplificazione. Ciò è stato ulteriormente confermato a seguito della *pipeline* bioinformatica, che ha restituito solamente due sequenze utilizzabili, di cui una appartenente ad un piccolo crostaceo tipico delle acque dolci permanenti dell’area mediterranea (i.e., un copepode ciclopoide appartenente al genere *Mesocyclops*). Il pattern qui discusso è stato riscontrato in tutte le sequenze prodotte, rendendo quindi non attendibili i risultati ad oggi ottenuti. Ad oggi, si attendono ulteriori risultati da parte della MACROGEN in termini di ottimizzazione delle analisi e rianalisi dei campioni inviati, procedendo quindi con nuovi sequenziamenti che avverranno nelle prossime settimane.



Raccolta di campioni di acqua per l'analisi del DNA ambientale (Lago Pozzillo)



Filtraggio ed isolamento del DNA ambientale a partire dal campione d'acqua

Raw Data Statistics

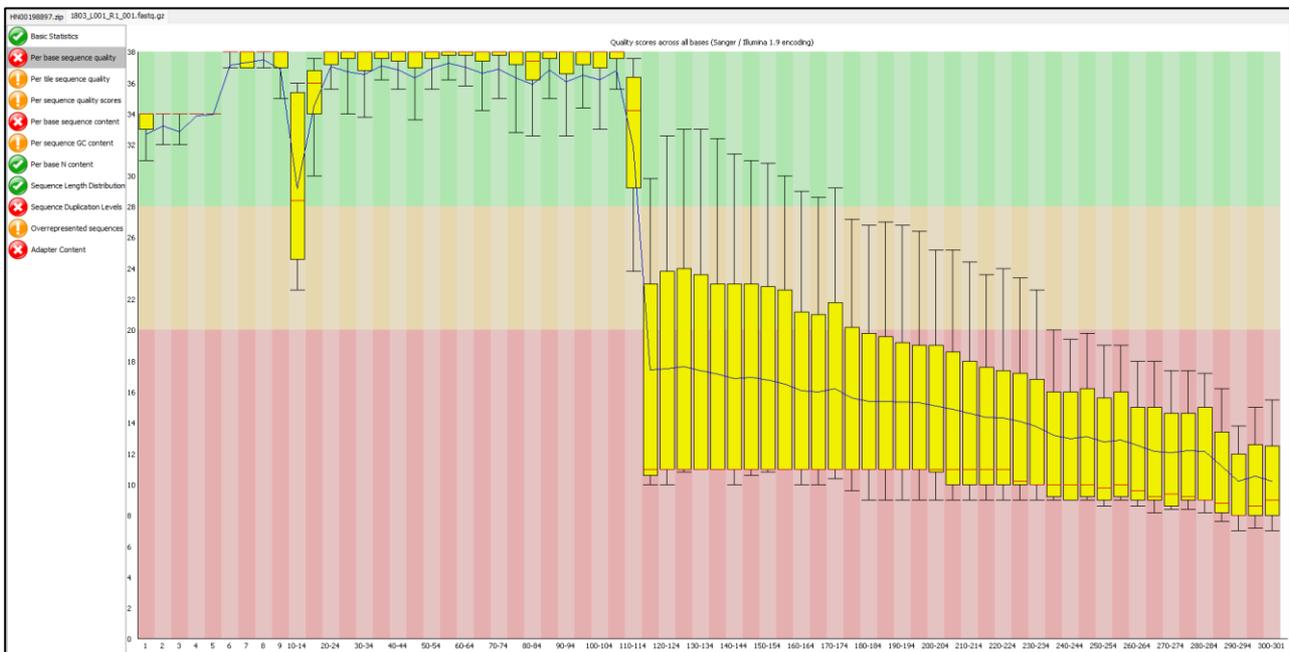
- The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples.
For example, in 1803 sample, 300,554 reads are produced, and total read bases are 90.5 Mbp.
The GC content (%) is 42.9% and Q30 is 34.4%.

* Raw Data

Sample ID	Total bases(bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
1803	90,466,754	300,554	42.9	57.1	44.6	34.4
1804	59,297,000	197,000	43.3	56.7	43.2	32.6

- Sample ID : Sample name.
- Total bases(bp) : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read1 and read2.
- GC(%) : Ratio of GC content.
- AT(%) : Ratio of AT content.

Statistica dei dati grezzi ottenuti dal sequenziamento NGS di due campioni di eDNA (i.e., 1803 e 1804).



Controllo qualitativo delle reads ottenute. Il grafico ci evidenzia come la read in questione, appartenente al campione 1803, risulta avere una bassa qualità a partire dalla base 115 fino alla base 301.

WP2: Stima della struttura e della fenologia di popolazioni selezionate

La stima della struttura delle popolazioni e della fenologia di *Procambarus clarkii* in Sicilia è stata condotta presso il sito di Gorgo Basso nel comprensorio della Riserva Naturale Integrale “Lago Preola e Gorghi Tondi” gestita da WWF Italia. L’area rappresenta il primo sito in cui *Procambarus clarkii* è stato segnalato in Sicilia e l’abbondanza della popolazione presente, unitamente alla facilità di accesso grazie agli accordi in essere con l’Ente Gestore, lo rendono un sito particolarmente idoneo ad effettuare pescate sperimentali ripetute nel tempo per valutare la struttura della popolazione e le sue variazioni.

Le attività di studio hanno previsto la messa in cattura delle nasse con esca trofica con cadenza mensile, al fine di raccogliere un campione significativo della popolazione presente. Gli animali catturati sono stati quindi trasportati in laboratorio e conservati in freddo per le successive analisi.



Raccolta di dati biometrici su individui di Procambarus clarkii

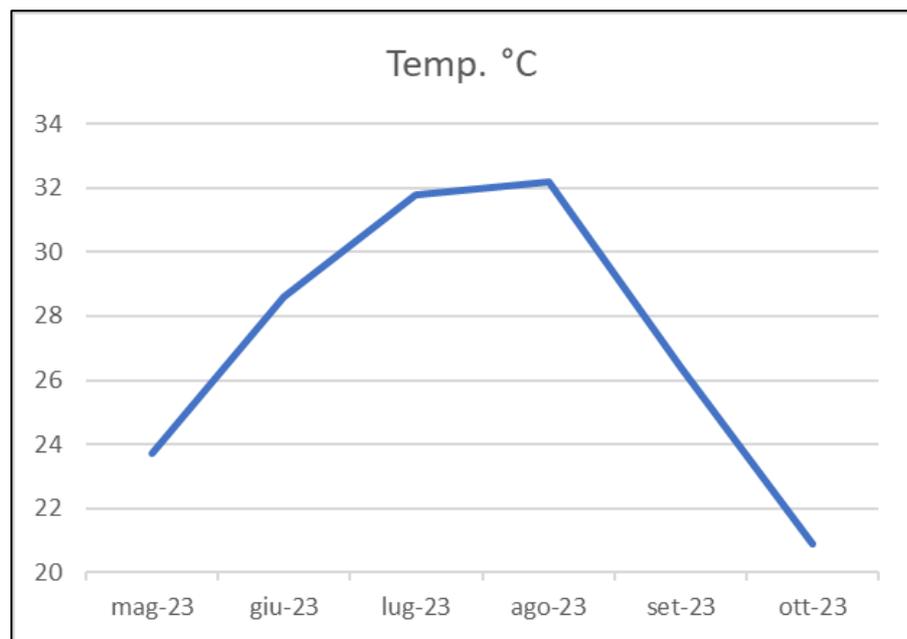
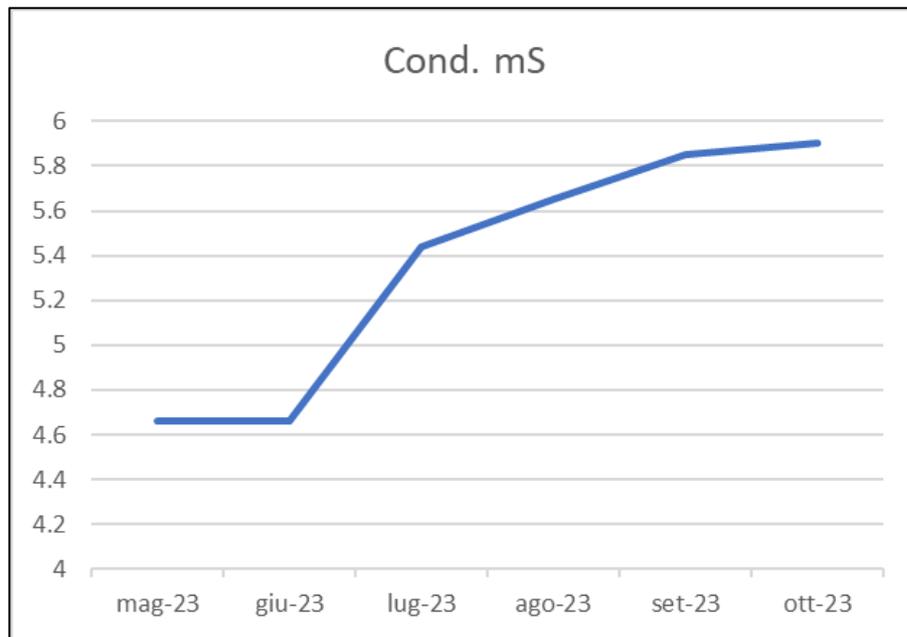
Per ogni campione temporale, gli animali sono stati suddivisi per sesso e sulla base della raggiunta maturità sessuale o meno, sono stati misurati e è stata verificata la presenza o meno di uova

sulle femmine. La sinossi dei dati raccolti ad oggi è riportato in tabella. Le informazioni così raccolte consentono di ricostruire importanti informazioni fenologiche, utili anche alla pianificazione di una più efficace gestione della specie in Sicilia.

Mese	maggio	giugno	luglio	agosto	settembre	ottobre
Cond. mS/cm	4.66	4.66	5.44	5.65	5.85	5.9
Temp. °C	23.7	28.6	31.8	32.2	26.4	20.9
Catture Tot	19	30	11	10	27	32
M	11	22	6	8	23	20
F	8	8	6	2	4	12
M maturi	10	22	6	8	23	18
F maturi	7	3	3	2	4	10
Maturi Tot	17	25	9	10	27	28
Immaturi Tot	2 (1 F e 1 M)	5 (tutte F)	3 (tutte F)	0	0	4 (2M e 2F)
Uova	no	no	sì (1)	no	no	no
Peso medio F mature	31.4	27.3	26.1	28.4	23.2	24.3
Peso DS F mature	8.4	2.3	6.9	14.3	9.7	7.1
Peso medio F immature	26.0	18.5	19.9	-	-	13.0
Peso DS F immature	10.1	3.6	3.8	-	-	2.6
Peso medio M maturi	31.9	21.2	21.2	23.2	18.8	20.4
Peso DS M maturi	10.5	7.4	6.6	7.9	3.8	6.1
Peso medio M immaturi	21.6	-	-	-	-	12.6
Peso DS M immaturi	4.8	-	-	-	-	0.9
Lung. media F mature	10.4	9.8	9.6	9.8	9.4	9.7
Lung. DS F mature	1.0	0.2	0.9	1.8	1.3	0.9
Lung. media F immature	10.0	8.9	9.1	-	-	7.8
Lung. DS F immature	1.4	0.6	0.5	-	-	0.7
Lung. media M maturi	10.1	9.0	8.9	9.1	8.7	8.8
Lung. DS M maturi	0.9	0.8	0.7	0.9	0.3	0.8
Lung. media M immaturi	9.8	-	-	-	-	8.0
Lung. DS M immaturi	0.7	-	-	-	-	0.1

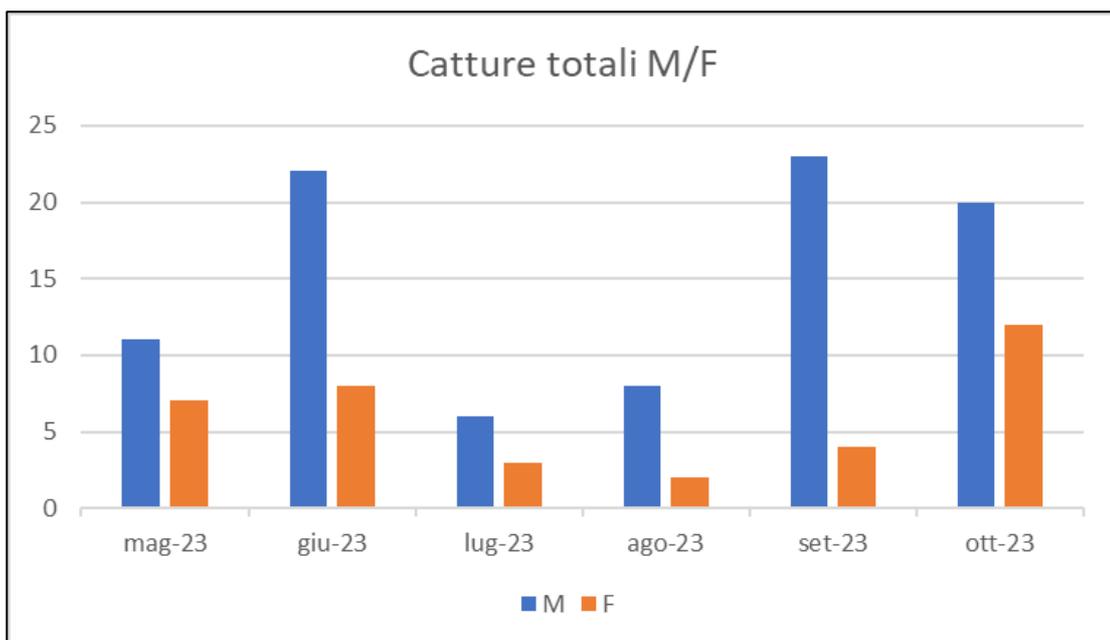
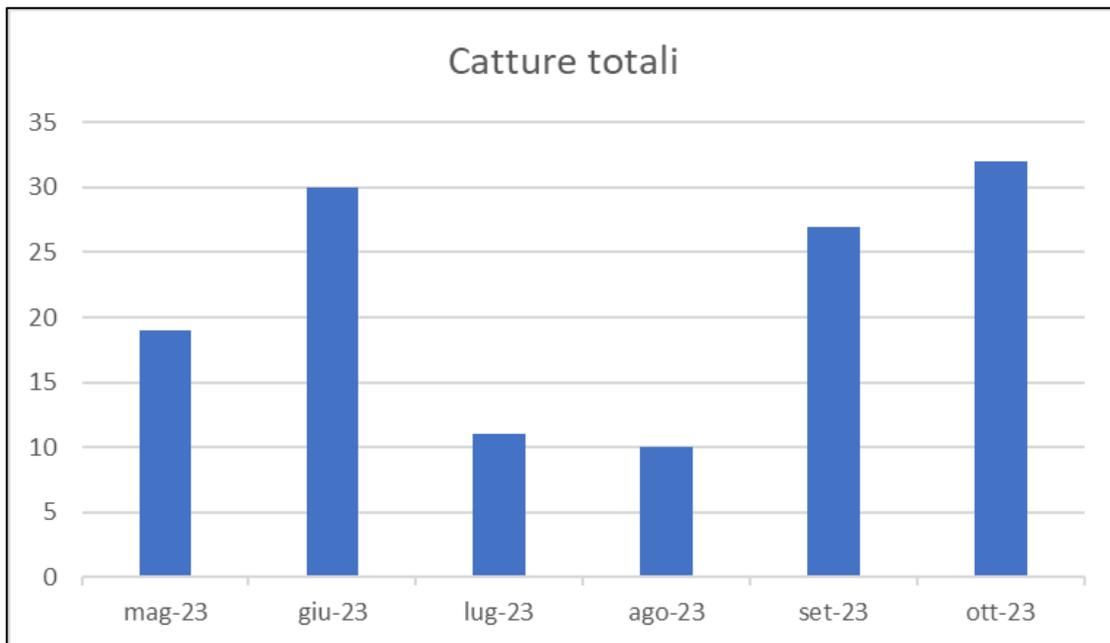
Dati fenologici e di struttura popolazionale. Cond. = conducibilità espressa in milliSiemens/cm; F = femmine; M = maschi; DS = deviazione standard; Lung. = lunghezza in mm dal rostro alla coda. Il peso è espresso in grammi, i conteggi sono espressi come numero medio di individui per nassa.

Nei grafici che seguono sono descritti gli andamenti di conduttività e temperatura del corpo d'acqua considerato, che hanno seguito una tendenza prevedibile con un incremento di entrambe le variabili durante i mesi più caldi.



Variazione mensile della conduttività (espressa in milliSiemens/cm) e della temperatura dell'acqua (espressa in gradi Celsius) dell'area campionata

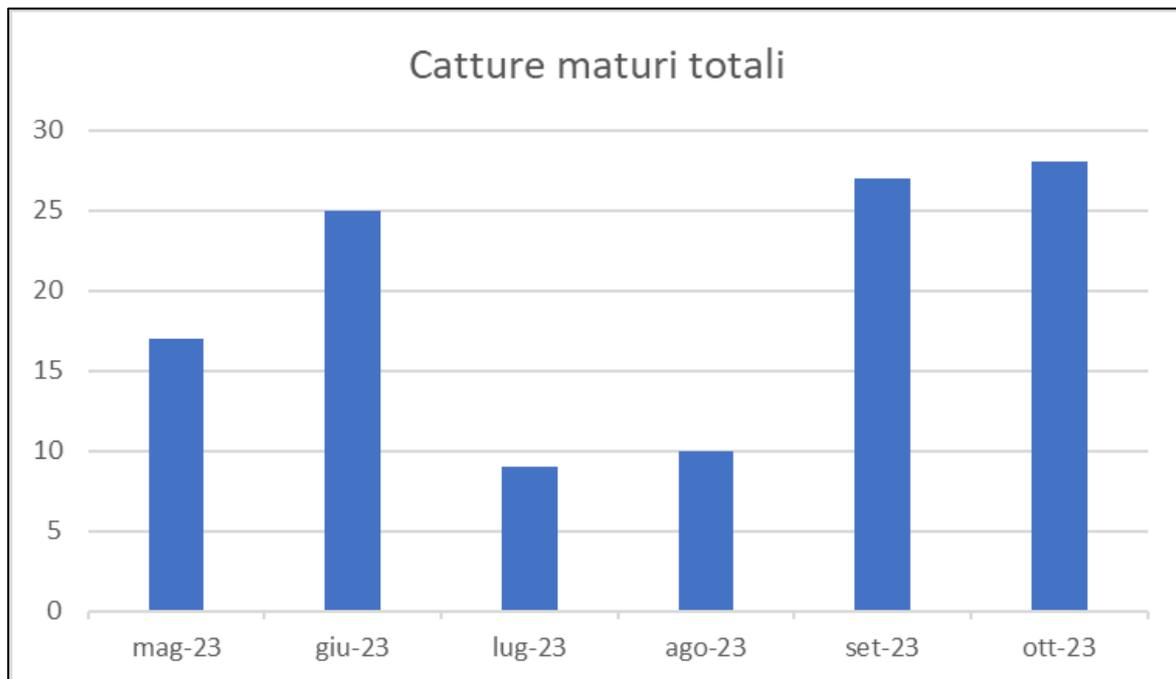
Gli andamenti mensili dell'abbondanza delle catture totali e delle catture per entrambi i sessi sono riportati nei seguenti grafici, che mostrano come ci sia un decremento per tutte le catture durante i mesi più caldi.

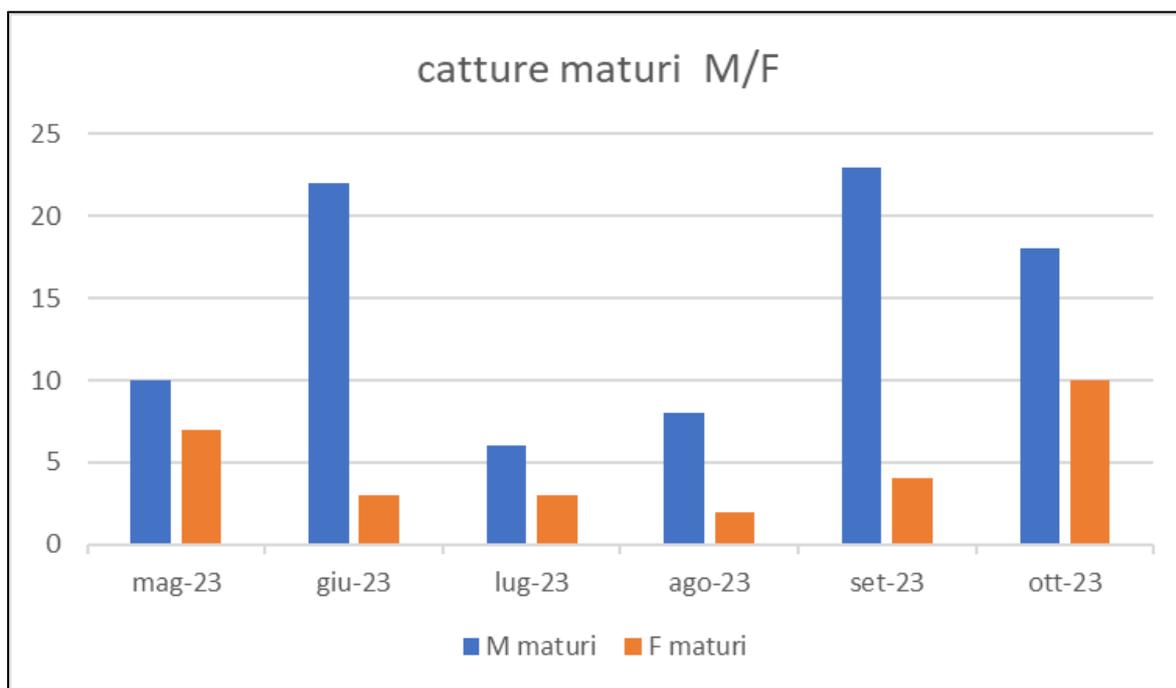


Andamento mensile delle sessioni di cattura (numero medio di catture per nassa) per il campione totale e per sessi separati

Le femmine sembrano generalmente catturate in minor misura rispetto ai maschi. Questo risultato non è necessariamente indicativo di una *sex ratio* sbilanciata, ma verosimilmente dipende da differenze comportamentali che conferiscono ai maschi una maggiore probabilità di cattura. Le femmine, infatti, dopo la deposizione mantengono le uova adese ai pleopodi sotto l'addome, le ossigenano costantemente e le mantengono pulite per evitare infezioni fungine, inoltre dopo le

schiose proteggono e tengono aggregati i nuovi nati per un periodo più o meno lungo. Queste cure parentali comportano una fase di inattività in cui le femmine non abbandonano mai i propri rifugi e non si alimentano. Per questo motivo, per avere stime migliori del rapporto fra le classi di sesso, vengono utilizzate le trappole-rifugio (ART – *artificial refuge trap*). Tuttavia, nel sito indagato nella presente sezione le ART non hanno sortito risultati significativi, probabilmente a causa dell’altissima disponibilità di rifugi “naturali” presso la massicciata che circonda buona parte dell’area ripariale del Gorgo Basso. Questo dato è confermato anche dalla variazione mensile delle catture, considerando solo gli individui maturi, descritto dal seguente grafico, che indica come le femmine siano ancora meno rappresentate a partire dal mese di giugno.





Andamento mensile delle sessioni di cattura (numero medio di catture per nassa) per gli individui maturi, sul campione totale e divisi per sesso

Questo risultato riflette bene quanto è noto per questa specie, le cui popolazioni alloctone possono avere periodi riproduttivi variabili. La specie può riprodursi tutto l'anno nell'areale nativo e in territori subtropicali o temperati caldi (es. Penisola Iberica) o può avere un solo periodo riproduttivo coincidente con i mesi più caldi nei paesi con climi temperati freddi (es. Germania). In Italia la fenologia riproduttiva consta generalmente di due eventi, uno fra la primavera e il primo periodo estivo e uno a cavallo fra la fine dell'estate e l'autunno. In base ai risultati ottenuti nel contesto di questo studio non si può escludere un unico lungo periodo riproduttivo che ha luogo dall'inizio dell'estate all'autunno inoltrato. Questa considerazione nasce dalla scarsa frequenza di cattura delle femmine da giugno a ottobre e anche da dati più tangibili come il rinvenimento di uova e femmine ovigere in questo lasso di tempo anche in siti differenti da quello indagato per la fenologia (vedi figura successiva), utilizzando tecniche di ricerca attiva. In questi casi sono state registrate schiuse fino al 20/10/2023. Questo aspetto della fenologia merita certamente di essere approfondito con studi specifici.

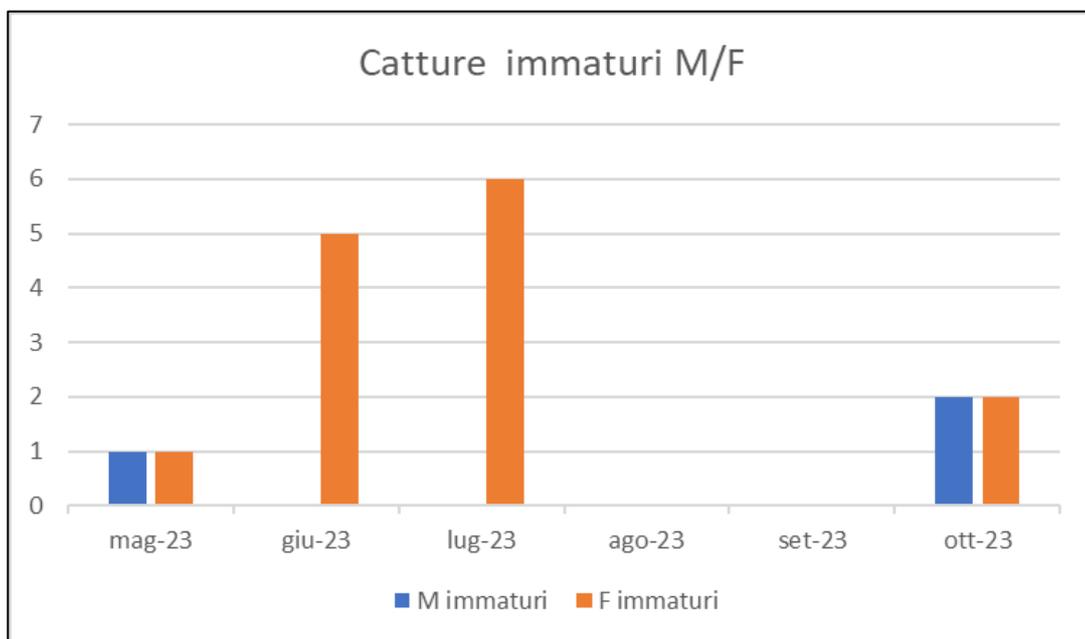


Femmina ovigera di Procamburus clarkii rinvenuta il 14/10/2023 presso il Lago Poma (PA)



Stadi giovanili di Procamburus clarkii nati da ovatura schiusa il 30/10/2023 (10 giorni di vita, lunghezza totale ~ 10 mm), provenienza: Lago Poma (PA)

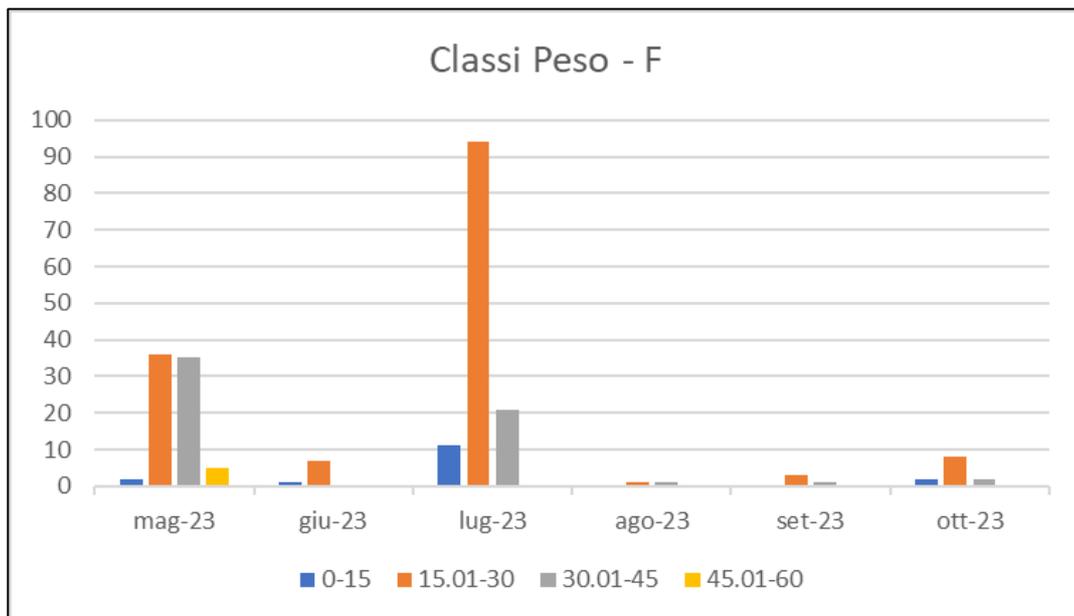
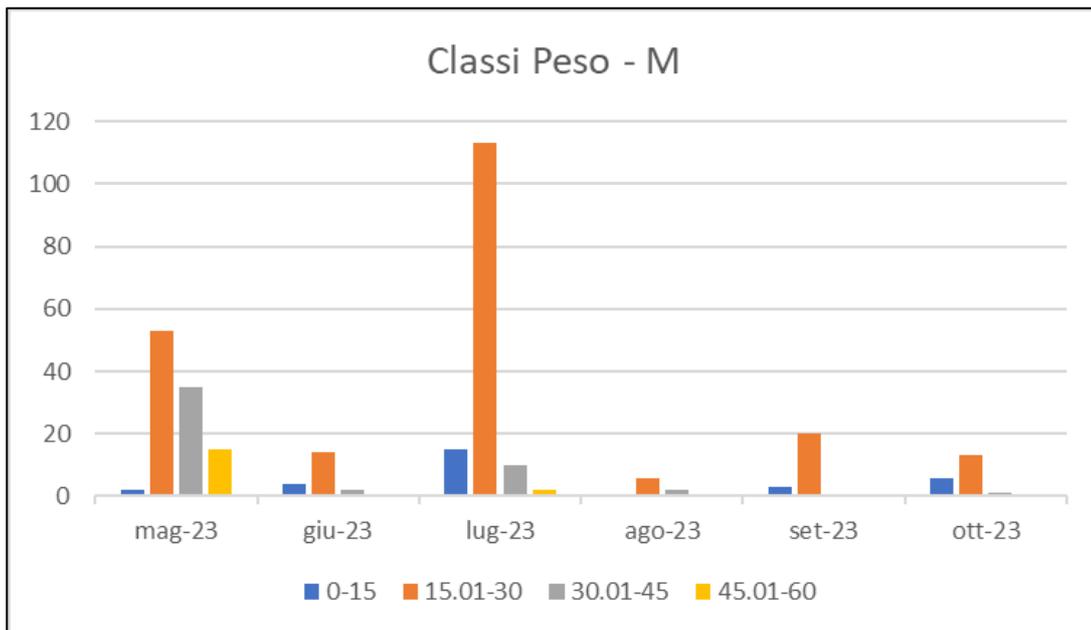
Il grafico successivo riporta l'andamento mensile delle catture di individui immaturi, che mostra una *sex ratio* totalmente sbilanciata verso le femmine fra giugno e luglio. L'andamento dei valori nel periodo considerato, con picchi di individui immaturi durante la prima metà dell'estate è un pattern già riscontrato in alcune popolazioni invasive di *P. clarkii*. In altri casi il numero di giovani subisce un incremento maggiore durante la seconda metà dell'estate, ma bisogna tener conto del fatto che i metodi di campionamento efficaci presso questo sito (nasse) tendono a non catturare in modo rappresentativo le classi di età più piccole, che pertanto vengono probabilmente sottostimate.



Andamento mensile delle catture di immaturi, espresse come numero medio di catture per nassa

La distribuzione delle classi di peso per mese e per i sessi separati è riportata nei seguenti grafici. L'andamento riscontrato è sovrapponibile in entrambi i sessi e mostra un picco a luglio e una complessiva dominanza numerica della classe di peso compresa fra i 15.01 e i 30 g, rappresentativa di individui di taglia medio-piccola. Tale risultato indica la presenza di una struttura di popolazione dominata da individui di giovane età. Gli individui appartenenti alle due classi di taglia più piccole (0-15; 15.1-30), costituiscono infatti da soli circa il 76% del campione totale preso qui in considerazione, costituito da 546 gamberi.

Una popolazione che presenta una larga porzione di individui di giovane età è generalmente caratterizzata da una potenziale tendenza all'incremento e, di conseguenza, a un forte rischio che si verifichino fenomeni di dispersione attiva, fenomeno frequente in casi di alta densità delle popolazioni e per il quale *P. clarkii* è notoriamente una specie vocata.



Variatione della distribuzione delle frequenze percentuali delle quattro classi di peso (esprese in grammi) durante i mesi di campionamento

Il grafico successivo riassume e mostra in modo esaustivo quanto riportato precedentemente rispetto alla variazione delle frequenze mensili delle classi di peso.

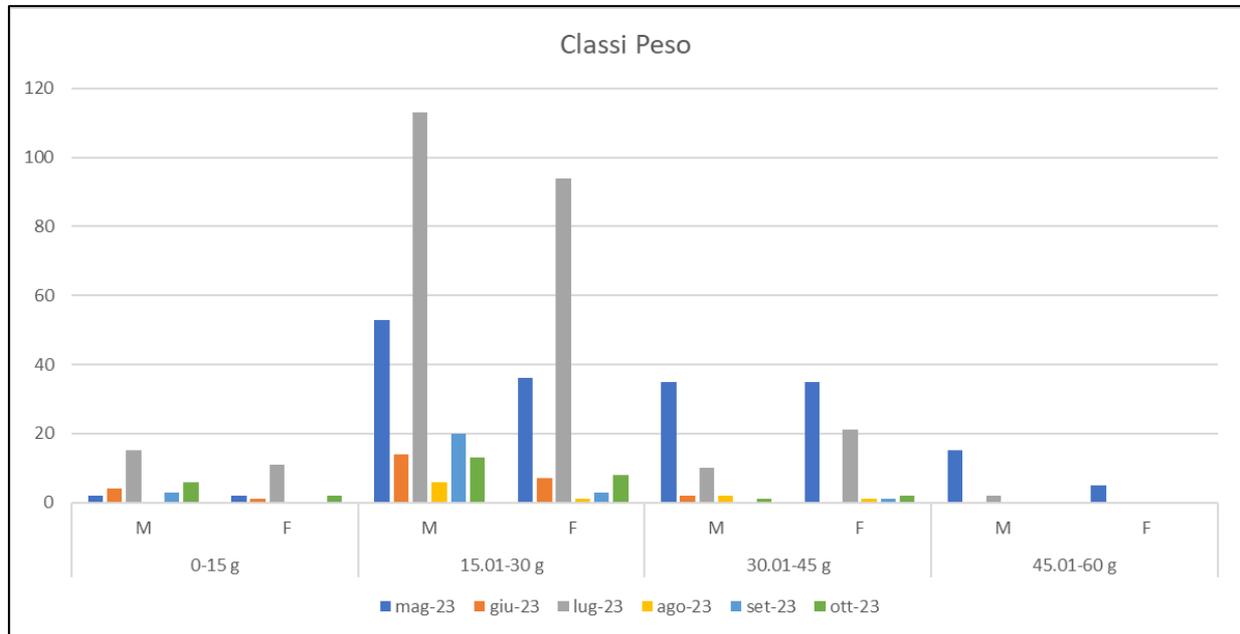
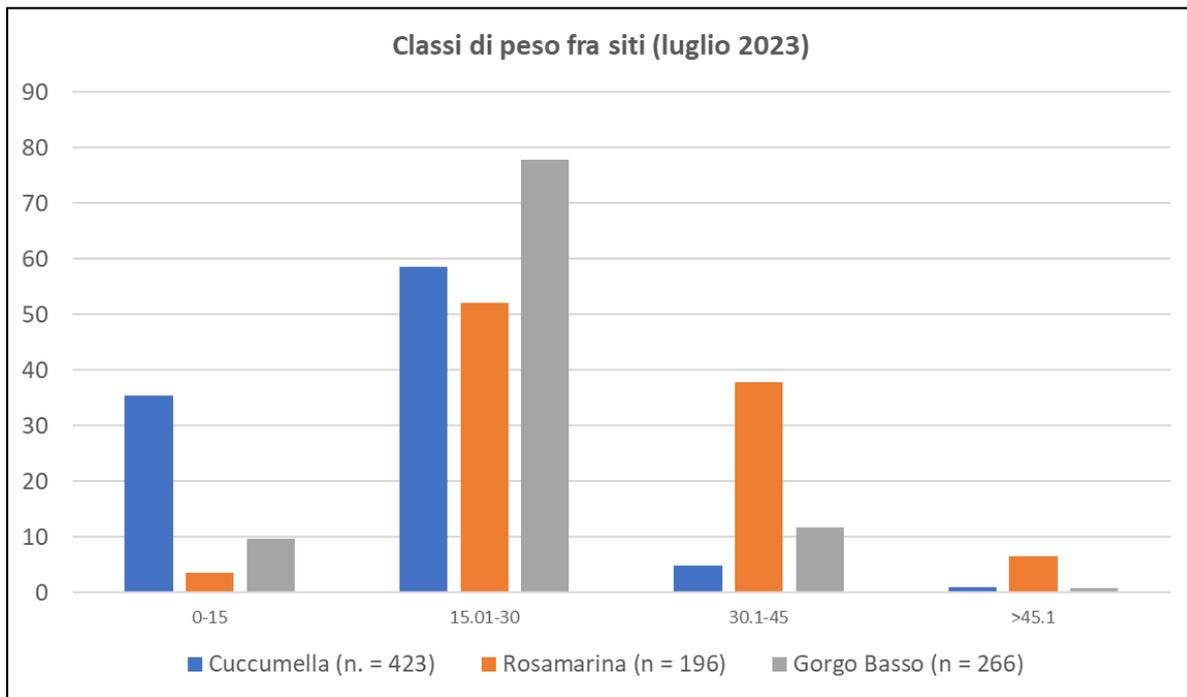


Grafico riassuntivo della variazione della distribuzione delle frequenze percentuali delle quattro classi di peso (esprese in grammi) durante i mesi di campionamento

Nella figura successiva è descritta la distribuzione delle classi di peso durante il mese di luglio dell'area di studio e quella dei siti Diga Rosamarina (PA) e Cuccumella (SR), per i quali è disponibile un campione di consistenza numerica adeguata. Si nota come in tutti e tre i casi la classe di peso dominante è quella medio-piccola, compresa fra 15.01 e 30 g.



Tuttavia, sono presenti alcune differenze evidenti. Il sito Cuccumella presenta una frequenza percentuale molto più consistente della classe di peso più piccola (35.5% vs 3.6 e 9.8%) e dunque un'età media presumibilmente minore rispetto agli altri due siti. Al contrario, il sito Rosamarina mostra una percentuale maggiore di individui della classe compresa fra 30.1 e 45 g (37.8% vs 4.9 e 11.7%) che fa pensare a un'età media presumibilmente maggiore. Inoltre, confrontando il numero medio di catture a nassa e assumendo che sia proporzionale alla densità di popolazione per i tre siti, si passa da densità molto alte di Gorgo Basso ($n = 30$) e Cuccumella ($n = 18.4$) a densità decisamente più basse del sito Rosamarina ($n = 3.2$). I siti Gorgo Basso e Cuccumella presentano, in definitiva, densità molto più alte di *P. clarkii* e popolazioni presumibilmente più giovani rispetto al Sito Rosamarina. Questo risultato dipende probabilmente dalle differenze strutturali dei tre siti che determinano un differente grado di idoneità per una specie legata soprattutto ad acque stagnanti e poco profonde. Gorgo Basso e Cuccumella, infatti, sono siti di estensione e profondità limitata rispetto a Rosamarina che è un grande vaso artificiale con un immissario (Fiume San Leonardo) a idroperiodo permanente. Inoltre anche altri fattori, considerati come limitanti, potrebbero giocare un ruolo decisivo, come ad esempio l'assenza di fauna ittica a Gorgo Basso e Cuccumella e la presenza massiccia di pesci introdotti nel sito Rosamarina, fra cui il Persico trota, *Micropterus salmoides*, specie di origine americana che preda in modo consistente i giovanili di *P. clarkii*, anche in popolazioni introdotte, limitandone la consistenza.

I risultati qui ottenuti suggeriscono che *P. clarkii* in Sicilia abbia una fenologia riproduttiva complessivamente paragonabile a quella di altre popolazioni italiane, con deposizioni e schiuse comprese fra primavera e autunno. In futuro varrà senza dubbio la pena di verificare se si possa trattare di un unico lasso di tempo, senza evidenti pause, in cui avviene la riproduzione (come suggeriscono i dati) o di due differenti periodi, in analogia a quanto accade in altre regioni italiane. Alcuni dei risultati preliminari qui descritti indicano che un altro obiettivo che meriterà di essere perseguito è l'estensione del campionamento a un maggior numero di siti con varie tipologie ambientali, è infatti noto che il ciclo annuale e, come emerge dai nostri risultati, la struttura di popolazione della specie possono modularsi in modo differente in relazione all'habitat.

Un altro dato che appare significativo per i siti qui trattati è una struttura di popolazione sbilanciata verso classi di peso piccole, che indicano una giovane età media della popolazione. Questo aspetto deve essere considerato a fini gestionali e conservazionistici, poiché è indicativo di un nucleo in crescita demografica che può rappresentare oltre che un notevole impatto per gli ecosistemi già colonizzati, una ulteriore "sorgente" per una dispersione "secondaria" dei territori circostanti.

WP3: Analisi della struttura genetica dei popolamenti siciliani della specie

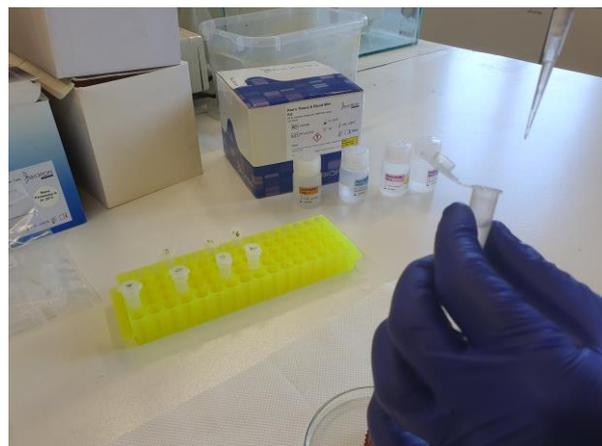
L'analisi di dati di natura molecolare, realizzata tramite la costruzione di *haplotype networks* e l'inferenza di alberi filogenetici, ha fornito importanti informazioni utili a ricostruire la storia e le dinamiche dell'invasione delle acque interne siciliane da parte della specie, individuare i possibili corridoi di espansione secondaria e/o gli eventi di introduzione multipla indipendente in siti diversi, e a stimare la connettività tra le popolazioni osservate.

Nell'ambito delle attività di campionamento svolte (cf. esiti WP1), qualora sia stata riscontrata una qualsiasi traccia (resti di esoscheletro, individui vivi o morti) di presenza del Gambero rosso della Luisiana, è stato effettuato un campionamento di 1-5 individui per sito in modo tale da poter effettuare le analisi molecolari previste dal WP3, ossia l'estrazione del DNA dal singolo individuo e la successiva amplificazione e sequenziamento del marcatore mitocondriale COI. Gli animali selezionati sono stati quindi fissati in situ e conservati in freezer in alcool etilico assoluto in attesa dello svolgimento delle analisi.

E' stata ad oggi realizzata l'estrazione del DNA su 61 esemplari utilizzando il kit d'estrazione della BIORON "Ron's Tissue & Blood DNA Mini Kit. In seguito, utilizzando il DNA estratto da ciascun individuo, è stato amplificato un frammento del marcatore mitocondriale COI tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando la seguente coppia di primer: COL6b: 5'-ACAAATCATAAAGATATYGG-3' e COH6: 5'-TADACTCDGGRTGDCCAAARAAYCA-3'.



Prelievo di un campione di muscolo



Estrazione di DNA tramite kit BIORON

Al fine di verificare la corretta amplificazione del frammento mitocondriale di interesse, gli amplificati ottenuti sono stati caricati su un gel di agarosio al 2% e, utilizzando un sistema di elettroforesi (composto da alimentatore Bio-Rad e da una vaschetta elettroforetica della Biosigma),

è stato possibile verificare, tramite transilluminatore a raggi UV, la presenza di una banda nettamente visibile dalla lunghezza di circa 1kb (coerente quindi con il peso molecolare atteso del frammento mitocondriale amplificato).

Gli amplificati sono stati inviati alla azienda MACROGEN ITALIA per il sequenziamento (tipo SANGER). Il sequenziamento ha generato 72 cromatogrammi sequenziati principalmente in direzione “*forward*”, ed alcuni in “*reverse*” (i.e., 61 cromatogrammi in direzione *forward* e 11 in direzione *reverse*). Tenendo in considerazione che nel processo di sequenziamento accade spesso che i cromatogrammi prodotti abbiamo del “rumore” di sottofondo, il sequenziamento “multidirezionale” ci ha permesso di verificare la correttezza delle sequenze prodotte avendo così dei dati affidabili per le successive analisi filogenetiche previste dal WP3.

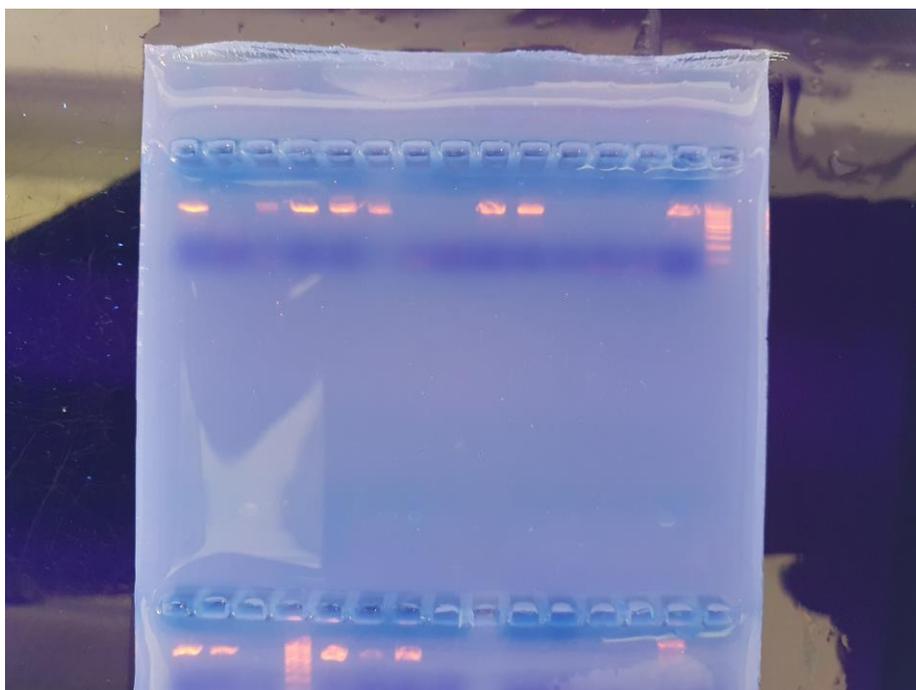
A seguito del controllo e pulizia delle sequenze ottenute, queste sono state accorpate in un singolo file denominato “FASTA” a cui sono state aggiunte 54 sequenze COI (provenienti da diverse aree geografiche, tra cui quella di origine del gambero rosso, ovvero la Luisiana - Stati Uniti d’America) disponibili sul database online “GENBANK” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Il file FASTA prodotto è stato poi utilizzato per allineare tutte le sequenze tra loro tramite il software “MEGAX” ottenendo così un allineamento di 115 sequenze con una lunghezza totale di 578 bp. Il file di allineamento finale è stato convertito in un formato idoneo (i.e., “NEXUS”) per procedere con l’inferenza filogenetica appropriata, ossia la rete aplo-tipica. Tale analisi è stata implementata attraverso il software PopART v.1.7 (<http://popart.otago.ac.nz>), impostando come metodo di analisi il “*Median-joining*” (Bandelt, Forster, & Röhl, 1999).

La rete aplo-tipica ci ha mostrato la presenza di un aplo-tipo principale, condiviso tra le diverse aree geografiche, in cui ricadono proprio la maggior parte dei nostri campioni di *Procambarus clarkii*. Inoltre, abbiamo riscontrato la presenza di due nuovi aplotipi esclusivi, relativi ad animali campionati alla Diga Rosamarina (Palermo) e al Lago Poma (Palermo). Tali nuovi aplotipi, così come altri, si differenziano dall’aplotipo maggiormente condiviso per solo un singolo step mutazionale.

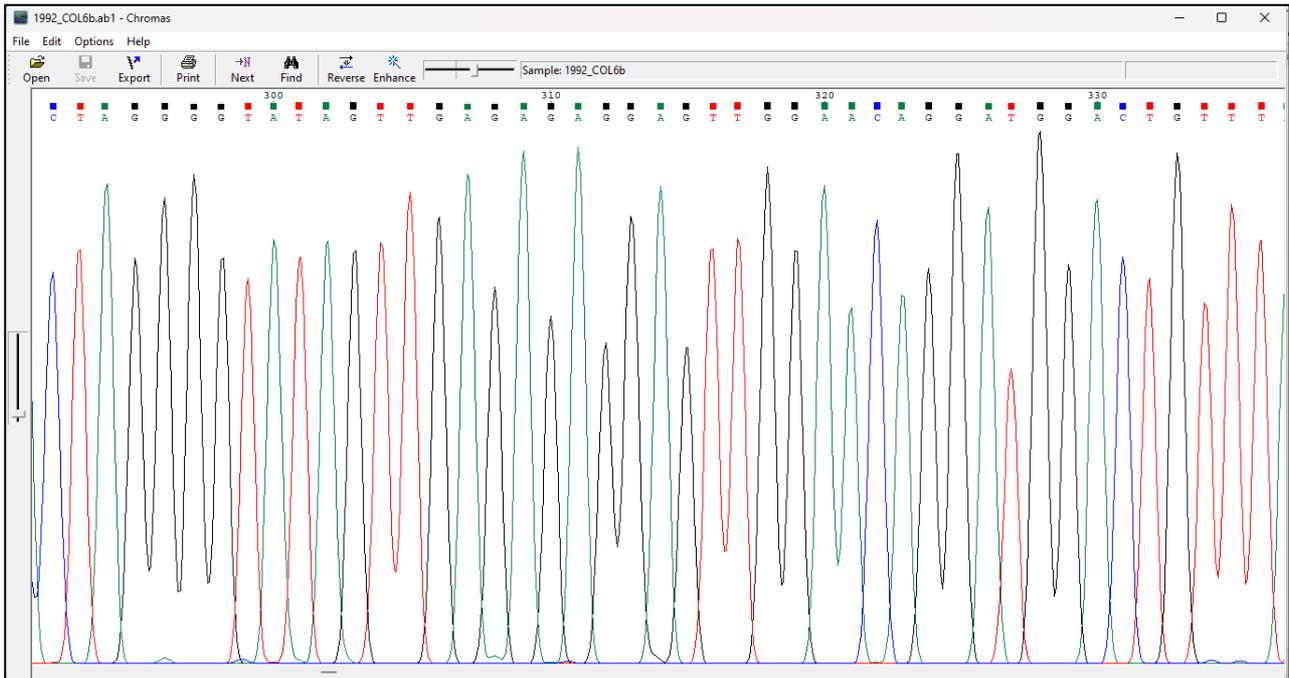
Alla luce dei risultati ottenuti, risulta evidente come la diffusione del gambero rosso in Sicilia sia legata ad eventi di introduzione multipla a partire dal medesimo stock, che corrisponde con ogni probabilità a quello commercializzato nel mercato acquariofilo italiano.

#	SITO	PROVINCIA	ESTRAZIONI TOTALI
1	Gorgo Basso	TRAPANI	10
2	Fiume San Leonardo/Diga Rosamarina	PALERMO	10
3	Risaie di Cuccumella	CATANIA	10
4	Fiume Irmínio	RAGUSA	5
5	Fiume Tellaro	SIRACUSA	4
6	Fiume Asinaro	SIRACUSA	4
7	Lago Santa Rosalia	RAGUSA	4
8	Lago Poma	PALERMO	4
9	Lago Olivo	ENNA	4
10	Biviere di Lentini	SIRACUSA	3
11	Stagni di Venetico	MESSINA	1
12	Lago di Villarosa	ENNA	1
13	Lago Gornalunga	CATANIA	1
TOTALI			61

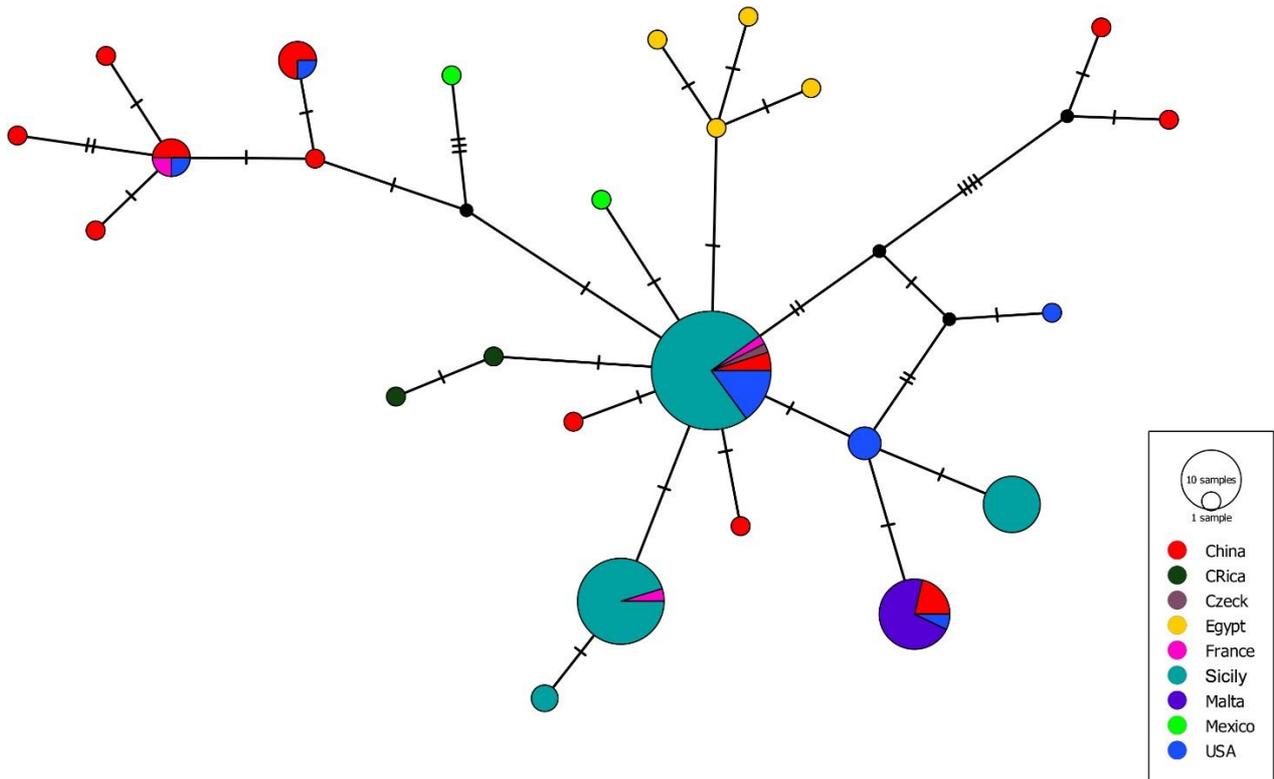
Numero e sito di appartenenza degli esemplari da cui è stato estratto il DNA.



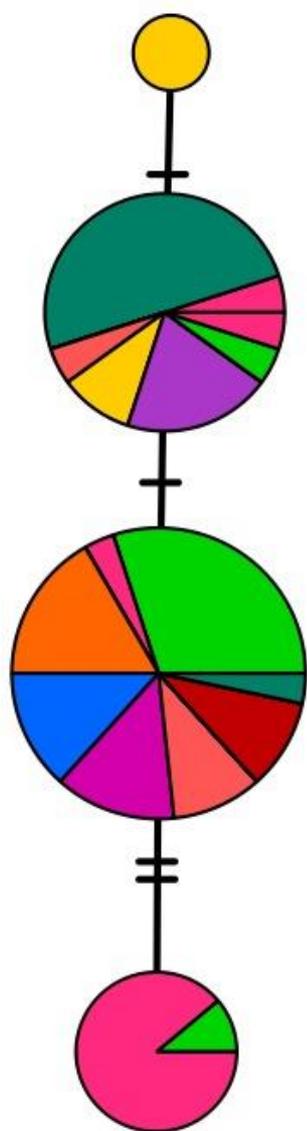
Esito dello scorrimento elettroforetico su gel di agarosio del prodotto PCR



Esempio di cromatogramma ottenuto a seguito del sequenziamento Sanger. Ogni picco colorato corrisponde ad una singola base azotata.



Rete aplotipica "Median-joining" basata su un frammento COI del DNA mitocondriale lungo 578 paia di basi. I trattini indicano gli step mutazionali. Ogni pallino rappresenta un aplotipo e la sua dimensione è proporzionale alla sua frequenza. Il pallino nero indica un aplotipo mancante.



Rete aplotipica "Median-joining" basata su un frammento COI del DNA mitocondriale lungo 578 paia di basi, relativa ai soli campioni siciliani. I trattini indicano gli step mutazionali. Ogni pallino rappresenta un aplotipo e la sua dimensione è proporzionale alla sua frequenza. Il pallino nero indica un aplotipo mancante.

WP4: Individuazione delle aree dove è possibile e prioritario intervenire con azioni di controllo o eradicazione

Obiettivo di questo work package è di utilizzare le informazioni raccolte in altre fasi del progetto per individuare le aree dove la realizzazione di azioni di contenimento o di eradicazione del gambero rosso della Luisiana è realizzabile e prioritaria. A tal fine si è tenuto in considerazione l' idoneità ecologica per la specie aliena invasiva e la vulnerabilità degli ecosistemi, con particolare riferimento alla presenza di habitat di interesse unionale (Direttiva 92/43/CEE) e l' inclusione delle aree di riferimento nel sistema dei Parchi e delle Riserve Naturali della Regione Siciliana e del sistema dei siti Natura 2000.

Il punto di partenza è il concetto classico di analisi del rischio, secondo il quale il rischio è inteso come la probabilità che un determinato fattore possa arrecare un danno più o meno grave ad un elemento sensibile ad un pericolo. In tal senso, allo scopo della presente analisi si definisce:

- Pericolo: l' elemento che potenzialmente può arrecare danno. In questo caso il gambero rosso della Luisiana e la sua potenzialità di colonizzare nuovi ambienti.
- Danno: le conseguenze che possono essere cagionate dal pericolo, determinate in questo caso dalle interazioni negative con habitat e specie autoctoni.
- Gravità: l' entità del danno cagionato dal pericolo. In questo caso si considera più grave l' interazione del gambero con specie o habitat sensibili e/o vulnerabili.
- Rischio: la probabilità che l' elemento in esame arrechi un danno di una certa gravità. In questo caso, valutare il rischio significa rispondere alla domanda: quanto è probabile che il gambero rosso della Luisiana arrechi un danno di rilevante gravità alle specie e agli habitat sensibili in Sicilia?

Aritmeticamente la valutazione del rischio può esprimersi con la seguente formula:

$$R = P \times G \times F$$

In cui R è il valore del rischio, P è la probabilità, G è la gravità, F è un fattore di esposizione al pericolo. Al limite, se uno dei fattori dell' equazione è pari a 0, il rischio è nullo, ovvero, nel caso in esame, a titolo esemplificativo, potrebbero verificarsi le seguenti situazioni:

- la probabilità di colonizzazione di una determinata area è nulla (massima sorveglianza, distanze molto elevate da siti già colonizzati, ecc.);
- la gravità dell'eventuale colonizzazione è nulla (viene colonizzato un ambiente completamente artificiale o antropizzato dove non è arrecato alcun danno);
- l'esposizione è nulla (il biotopo, seppure genericamente vulnerabile, non è idoneo alla specie, come nel caso di un ambiente non acquatico).

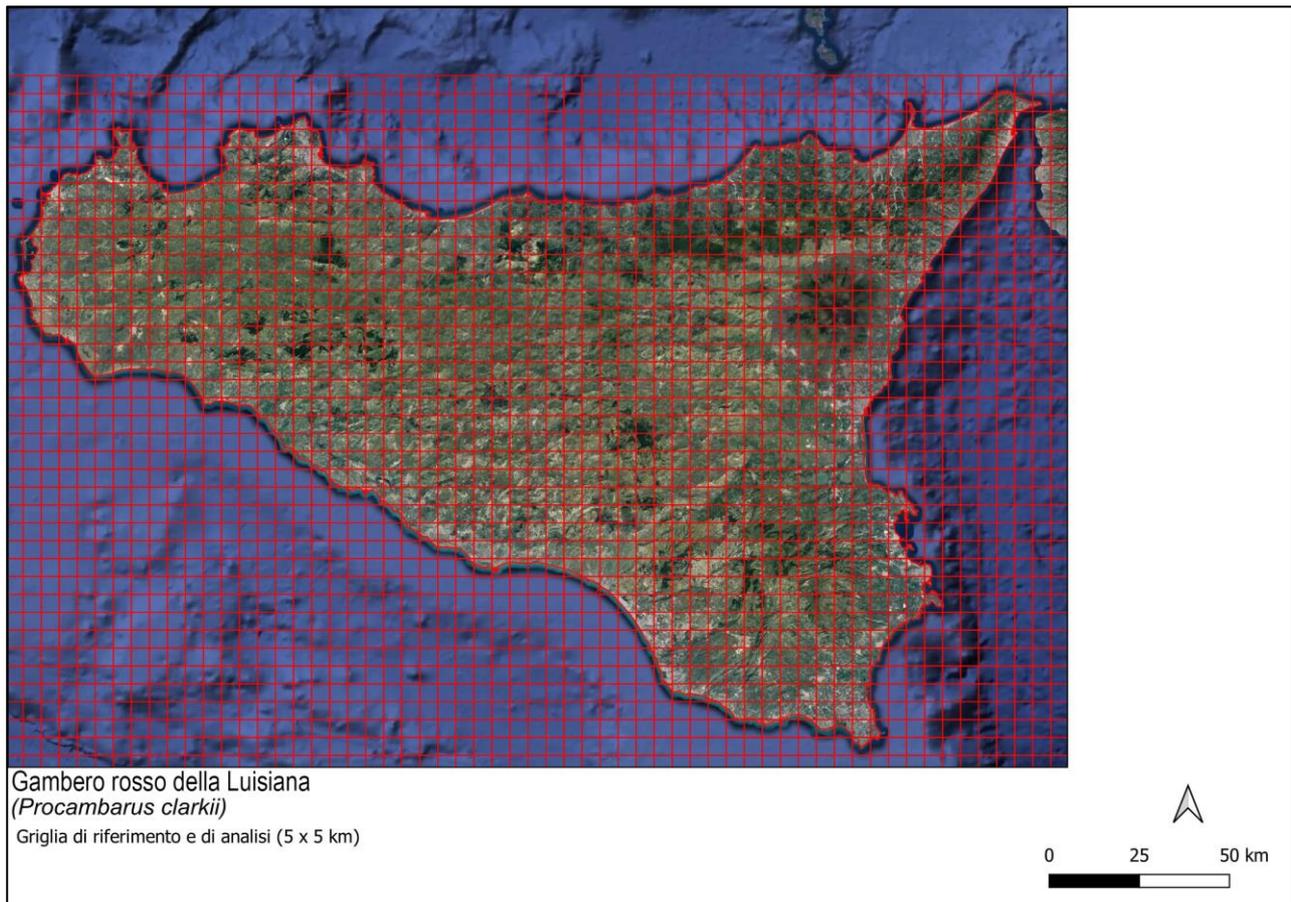
In questi casi limite il rischio sarebbe pari a 0. Tuttavia, nella realtà, ad eccezione dell'ultimo caso, considerare completamente nulli tali fattori è praticamente impossibile.

La procedura di valutazione del rischio passa spesso necessariamente da approssimazioni e semplificazione dettate dalla mancanza di tutti i dati numerici necessari a rendere l'equazione del rischio calcolabile aritmeticamente, soprattutto in ambiti come quello ecologico in cui i dati a disposizione sono perlopiù qualitativi e non quantitativi. Anche nel presente caso si è dovuto semplificare alcuni passaggi per ottenere una stima qualitativa del rischio, che comunque restituisce una base fondamentale per la pianificazione di gestione e di intervento. In particolare, si è reso necessario attribuire dei valori numerici arbitrari, secondo parere esperto dello staff di progetto, ad alcuni parametri utilizzati.

Ai fini del presente studio sono state prese in considerazione le informazioni geografiche messe a disposizione dalla Regione Siciliana (<https://www.sitr.regione.sicilia.it/geoportale>) per realizzare la valutazione del rischio. Le analisi sono state condotte in ambiente GIS (QGIS 3.30.2) incrociando vari strati informativi, descritti in seguito, con i dati raccolti sul campo nelle varie fasi di progetto.

Area di studio e unità di riferimento

L'area di studio considerata è l'intera superficie della Sicilia (s. s.), sulla quale è stata sovrapposta una griglia di riferimento e analisi a elementi quadrati con lato pari a 5 km (25 km²). La scelta di tale estensione è stata ritenuta ottimale per includere gli elementi essenziali di un'analisi ecologica a scala regionale.

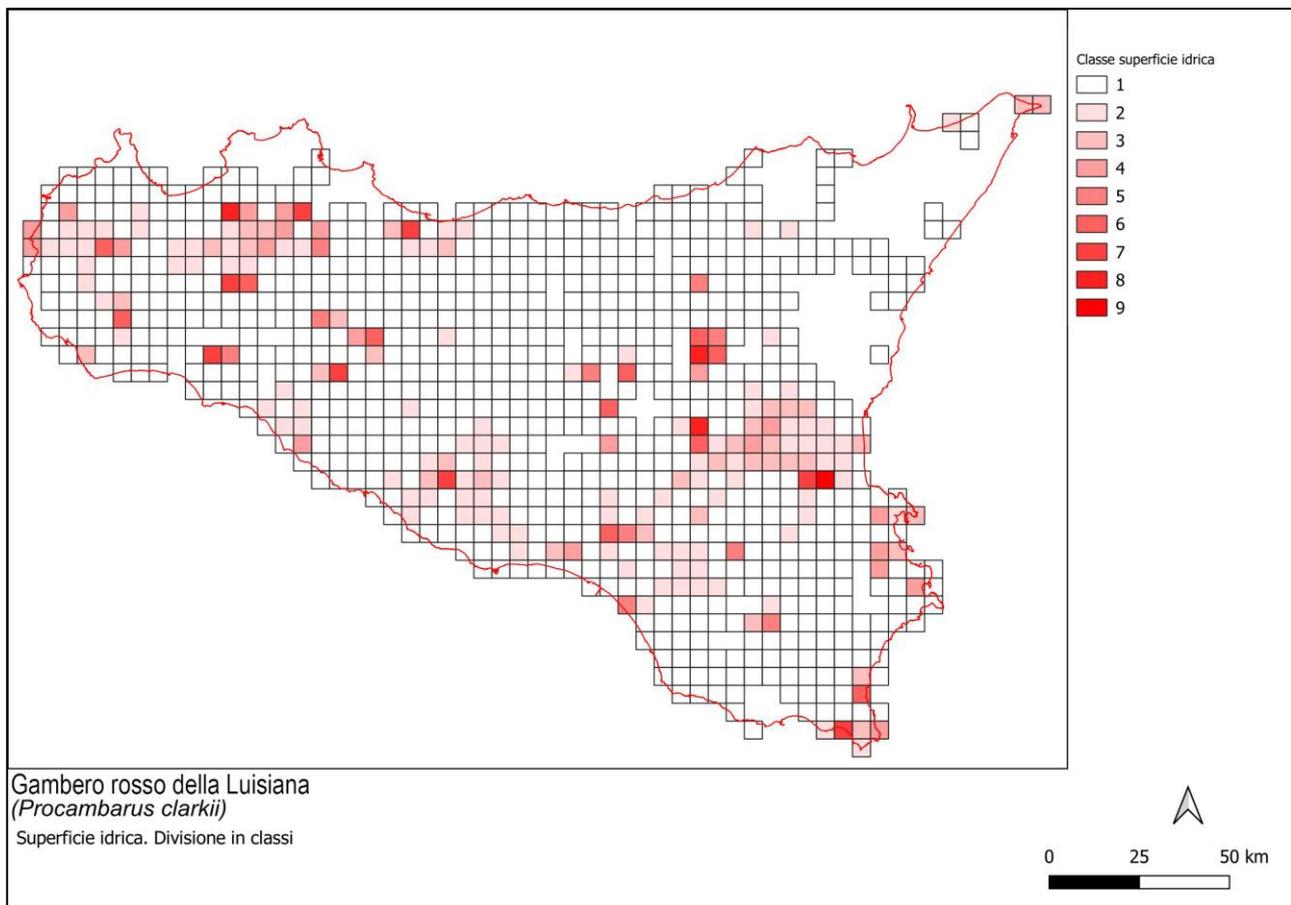


Griglia di riferimento e analisi per la valutazione del rischio

Stima della superficie idrica all'interno dei quadrati di riferimento

Al fine di valutare l'idoneità del territorio regionale per il gambero rosso della Luisiana, è stato preso in considerazione, come fattore determinante, la presenza di ambienti acquatici. Non è stata condotta in questa fase un'analisi ecologica più fine in conseguenza dell'elevata plasticità della specie target e del fatto che essa viene rinvenuta in ambienti sia lentici sia lotici, a svariati valori di salinità, e del fatto che, anche ad altitudini relativamente elevate, in Sicilia non sussistono condizioni climatiche che potrebbero escludere del tutto l'idoneità alla presenza della specie. Sono stati presi in considerazione gli strati informativi relativi ai bacini idrici (laghi, invasi e stagni agricoli) e dei corsi

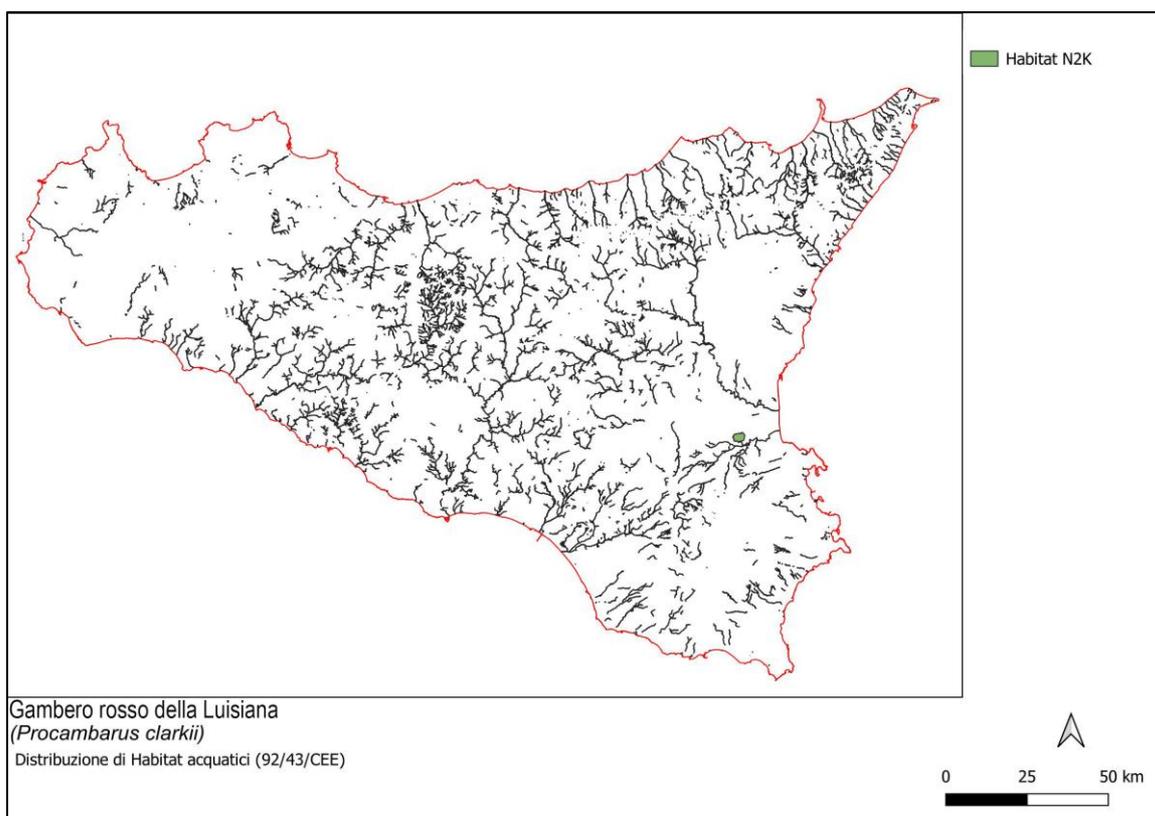
d'acqua (fiumi e torrenti). Relativamente a questi ultimi è stata fatta una selezione prendendo in considerazione i fiumi principali, escludendo quindi le aste minori verosimilmente a scorrimento intermittente. Sullo shapefile dei fiumi, di tipo lineare monodimensionale, è stato calcolato un buffer di 2 metri attribuendo quindi una superficie standardizzata utile a ricavare un dato di superficie altrimenti non valutabile. Le superfici dei bacini e dei fiumi sono state quindi unificate e ritagliate per intersezione con la griglia di riferimento, in modo da poter calcolare la superficie idrica per ogni quadrato di riferimento. I valori della superficie idrica sono stati categorizzati in 10 classi di distribuzione attraverso la suddivisione per intervalli naturali (metodo di Janks) al fine di ridurre al minimo la varianza interna. Su questa base è stata realizzata la carta della superficie idrica che è stata usata come surrogato dell'ideoneità alla presenza del gambero rosso della Luisiana.



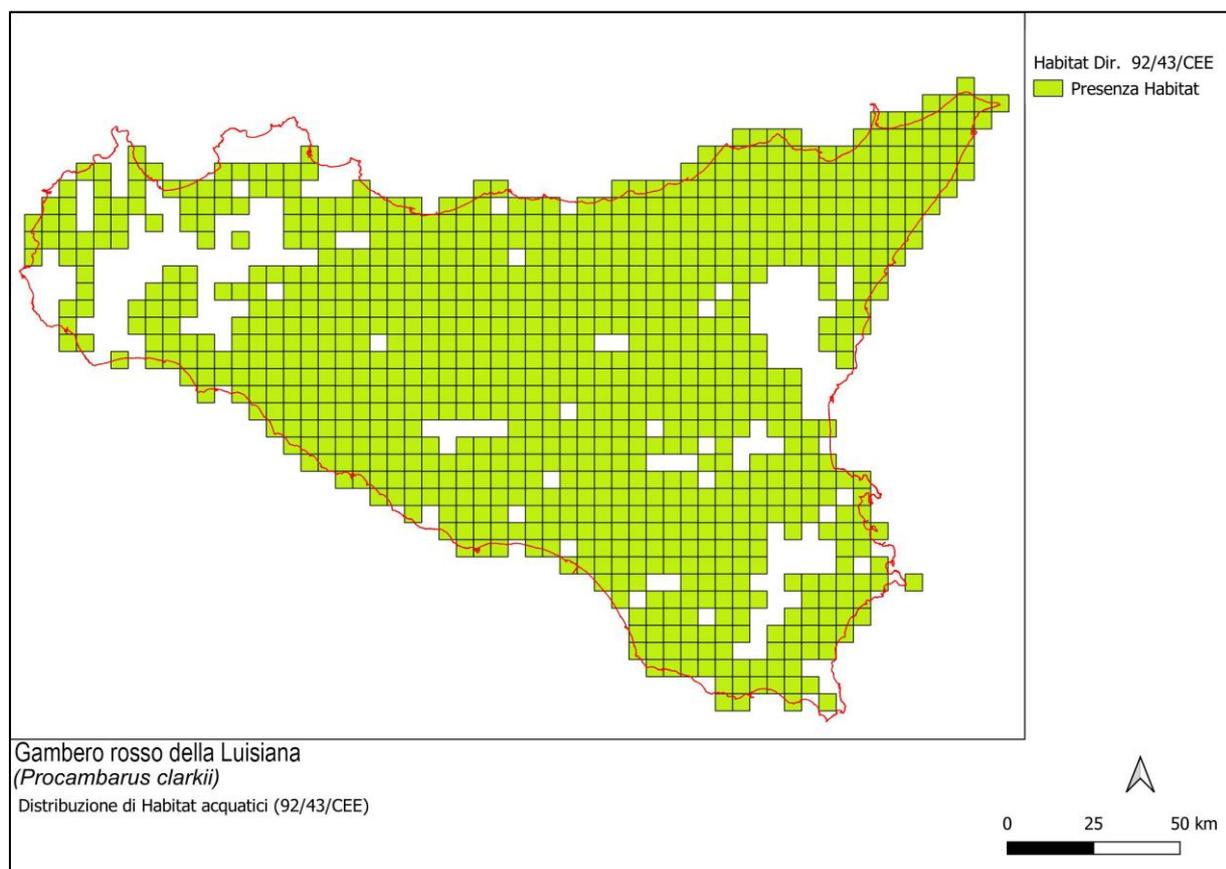
Suddivisione del territorio regionale in classi rappresentanti la superficie idrica. Il dato viene utilizzato come surrogato dell'ideoneità alla presenza del gambero rosso della Luisiana

Presenza di habitat ai sensi della Direttiva (92/43/CEE)

Come surrogato della sensibilità ecologica alla potenziale presenza del gambero rosso della Luisiana è stata presa in considerazione la presenza di habitat acquatici, potenzialmente colonizzabili dalla specie, inseriti nell'allegato I della Direttiva 92/43/CEE (Direttiva Habitat). La Regione Siciliana mette a disposizione gli strati geografici informativi relativi alle superfici territoriali interessate dalla presenza degli habitat in direttiva sia all'interno dei siti Natura 2000, sia esternamente ad essi. Per realizzare la mappa della sensibilità sono stati quindi estratte dai database geografici tutte le superfici interessate. Sulla base delle conoscenze dell'ecologia del gambero rosso della Luisiana sono state inserite o escluse le varie tipologie di habitat. Ad esempio, non sono stati inseriti gli ambienti di fiumara a flusso intermittente poiché considerati inidonei, visti i lunghi periodi di asciutta di questi corsi d'acqua. Successivamente la distribuzione degli habitat è stata sovrapposta alla griglia di riferimento in modo da attribuire un valore quantitativo costante ai quadrati con presenza di habitat e un valore neutro ai quadrati dove non si registra presenza di habitat di interesse unionale.



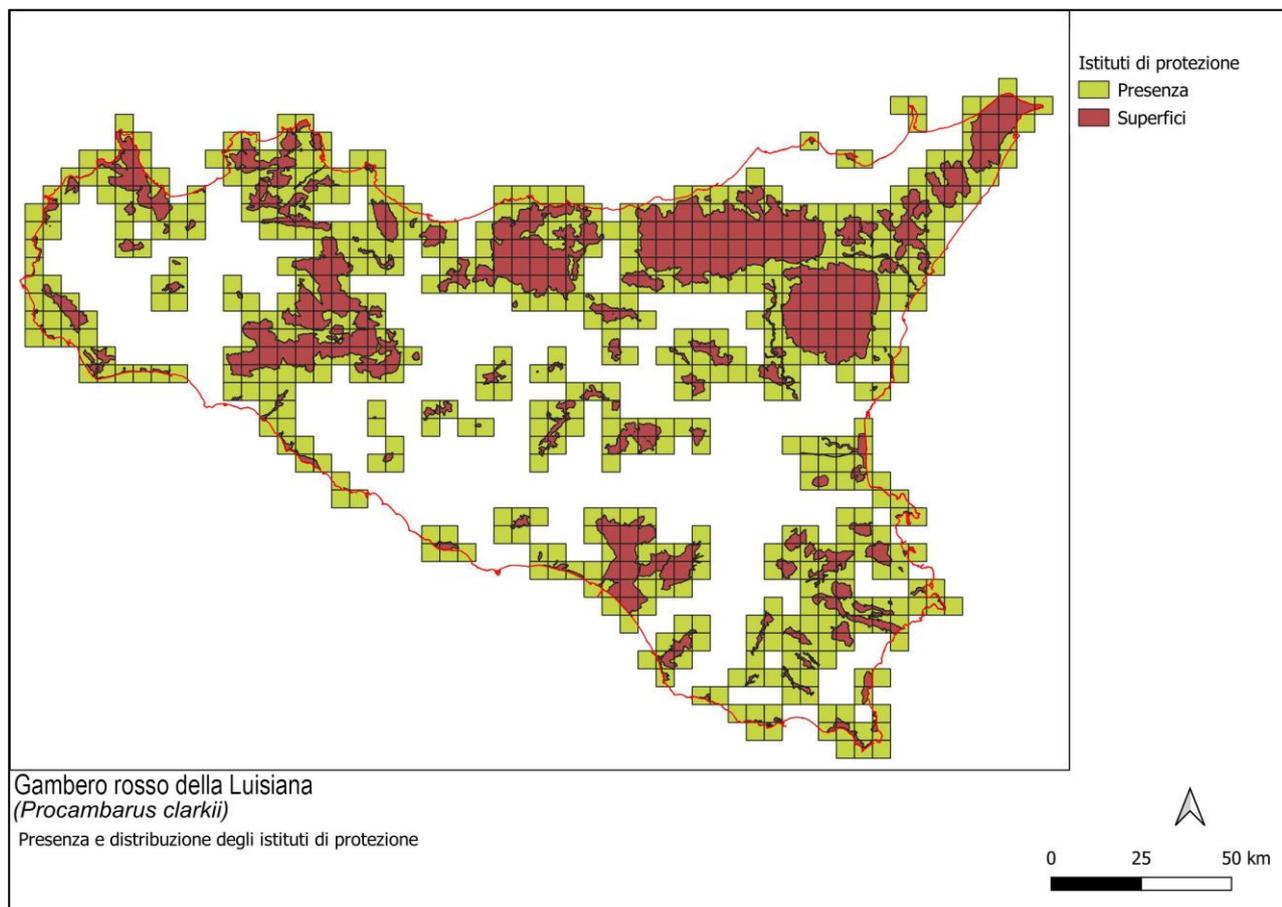
Presenza sul territorio regionale degli habitat di interesse unionale potenzialmente colonizzabili dal gambero rosso della Luisiana (fonte: geoportale Regione Siciliana)



Distribuzione sul territorio regionale degli habitat di interesse unionale potenzialmente colonizzabili dal gambero rosso della Luisiana su scala di riferimento del quadrato di 5 km di lato.

Presenza di aree tutelate

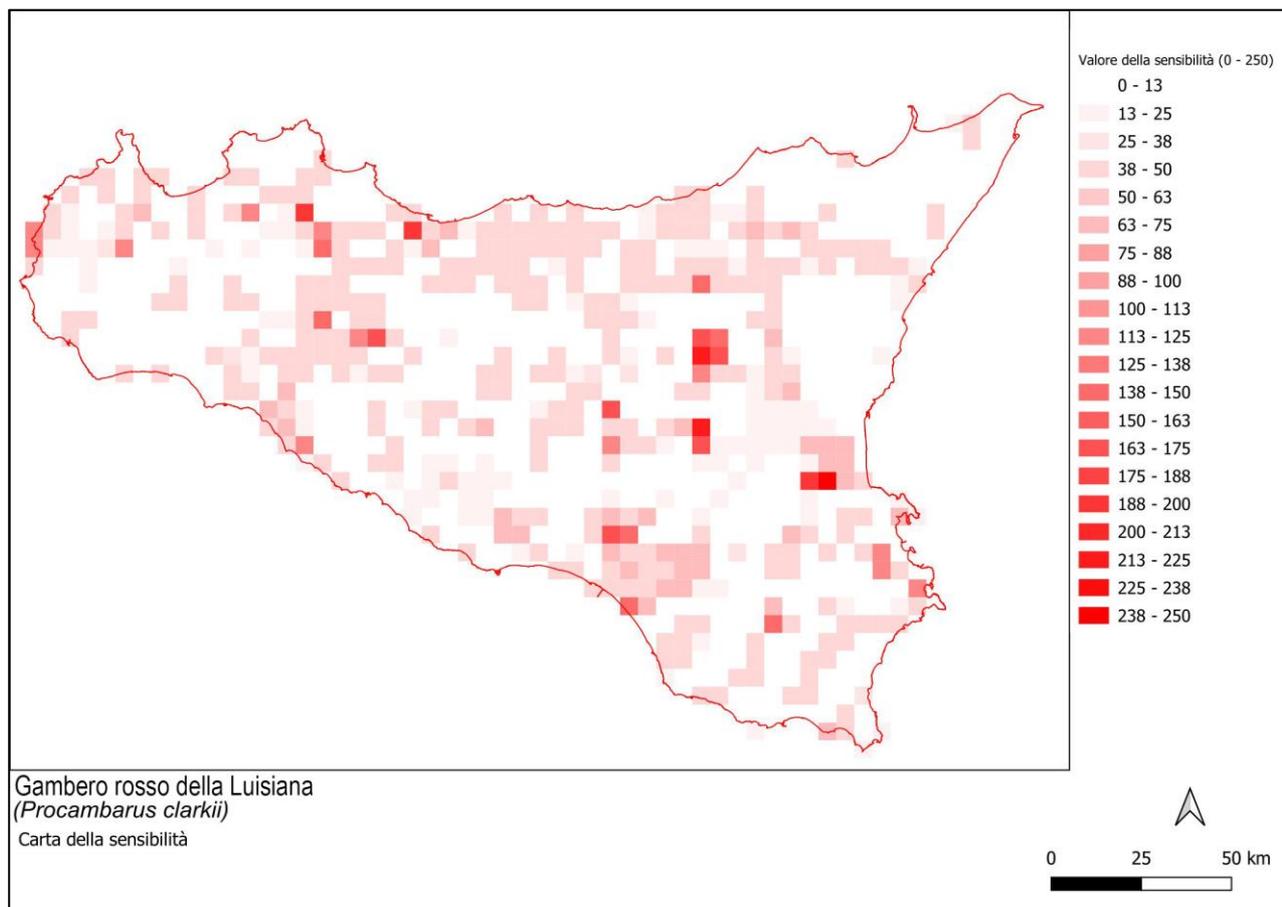
Al fine di ottenere uno strato informativo da sovrapporre ai precedenti per la valutazione del rischio, tutti i poligoni relativi a Parchi Naturali Regionali, Riserve Naturali e siti della rete Natura 2000 sono stati fusi in un unico livello, che è stato quindi sovrapposto alla griglia di riferimento con quadrati di 5 km di lato. Anche in questo caso, come già fatto per la presenza di habitat di interesse unionale, alla presenza di aree protette è stato attribuito un valore numerico costante, mentre ai quadrati che non si sovrappongono ad aree tutelate è stato attribuito un valore neutro. Non è stata fatta differenza di valore tra Parchi, Riserve e siti Natura 2000, in quanto tutte le categorie di aree di protezione hanno lo scopo di tutelare habitat e specie sensibili. In particolare, la presenza di habitat di interesse unionale all'interno di istituti di protezione individua una elevata sensibilità al danno potenziale, per cui la colonizzazione da parte della specie aliena invasiva di tali contesti è considerata di massima gravità nella scala dei valori del rischio.



Presenza e distribuzione sul territorio regionale degli istituti di protezione (Parchi Regionali, Riserve Naturali e siti Natura 2000).

Analisi complessiva della sensibilità

Gli strati informativi precedentemente realizzati sono stati utilizzati per redigere la carta della sensibilità alla colonizzazione da parte del gambero rosso della Luisiana. In particolare, i valori attribuiti ad ogni singolo quadrato di riferimento sono stati moltiplicati tra di loro in modo da ottenere un valore, per ogni quadrato, che tenga di conto dell'ideoneità ambientale, della presenza di habitat sensibili e della presenza di aree tutelate. Ovviamente la grandezza del quadrato di riferimento non consente di ottenere un dettaglio di massima precisione rispetto al singolo sito sensibile, ma permette di porre l'attenzione sul contesto geografico in cui è verosimile che la presenza del gambero possa arrecare un danno grave agli ecosistemi naturali. Il successivo riferimento alla presenza delle aree protette e dei singoli biotopi presenti nel quadrato in esame consentono di ottimizzare l'analisi in funzione dell'intervento da realizzare.



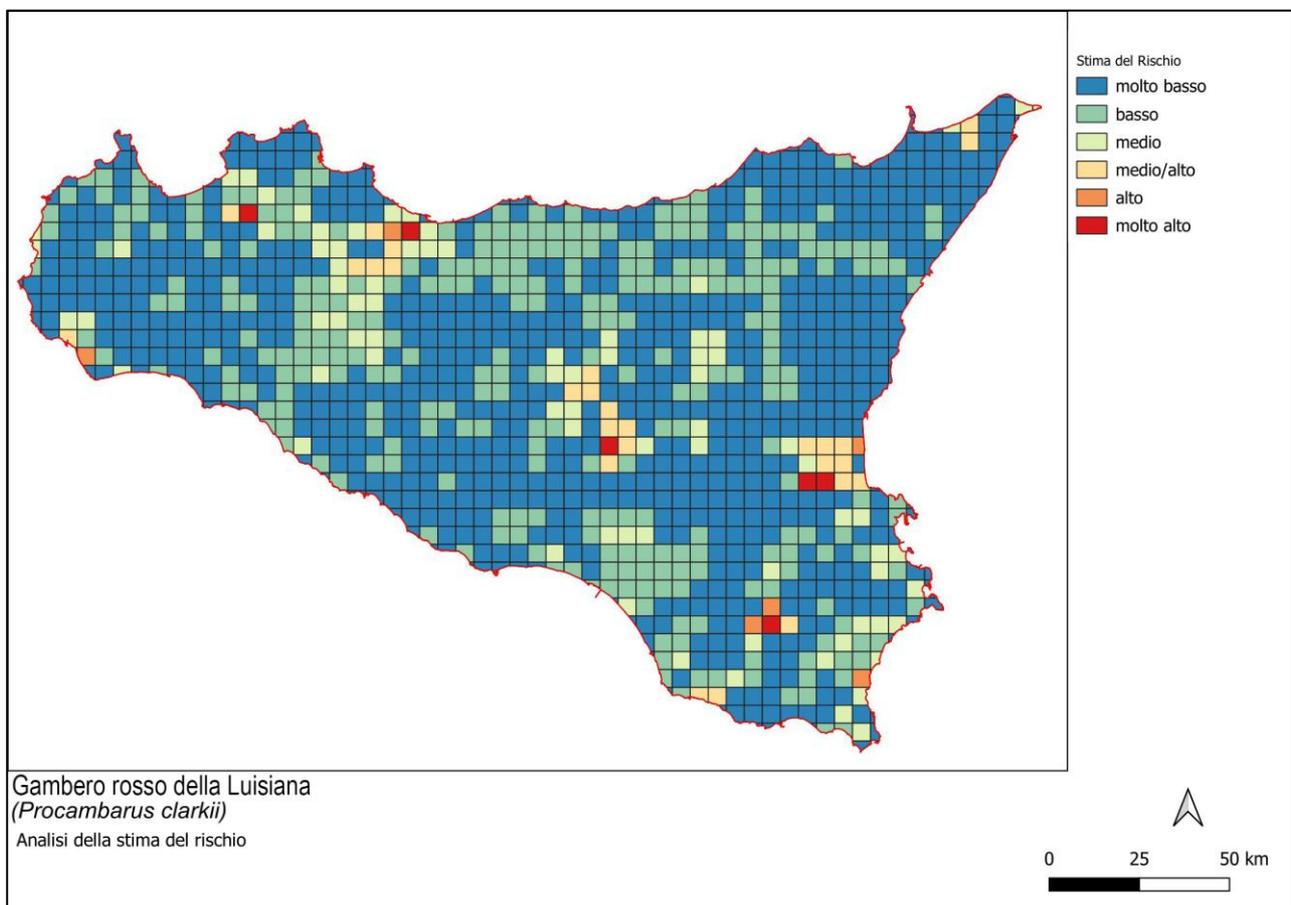
Carta della stima della sensibilità alla potenziale presenza del gambero rosso della Luisiana

Distanza dal punto di presenza certa più prossimo

A seguito delle indagini sul campo effettuate e al relativo aggiornamento delle conoscenze della presenza del gambero rosso della Luisiana sul territorio regionale, è stata realizzata la carta di prossimità dal punto più vicino di presenza certa. Attraverso la procedura Closest point (QGIS) è stata calcolata, per ogni quadrato di riferimento, la distanza in metri dal punto di presenza più prossimo. I valori, per ogni quadrato, sono stati poi categorizzati in 4 classi, tenute conto le caratteristiche ecologiche del gambero della Luisiana (0-1 km, 1-5 km, 5-10 km, oltre 10 km). I quadrati che registrano una prossimità inferiore al chilometro mostrano la massima probabilità di diffusione della specie. È noto in letteratura, infatti, che il gambero è capace di spostamenti fuori dall'acqua pari o superiori a tale distanza. La prossimità è stata utilizzata come surrogato della probabilità di nuova colonizzazione. In questo caso si intende esclusivamente la colonizzazione "naturale", cioè non direttamente mediata dall'uomo. È evidente che trasporto e rilascio antropico attivo, volontario o involontario, in nuovi siti non ancora colonizzati, esula da qualsiasi valutazione

probabilistica, salvo individuare fattori preferenziali di rilascio intenzionale, come potrebbero essere la vicinanza dalle strade e la conseguente maggiore accessibilità del sito.

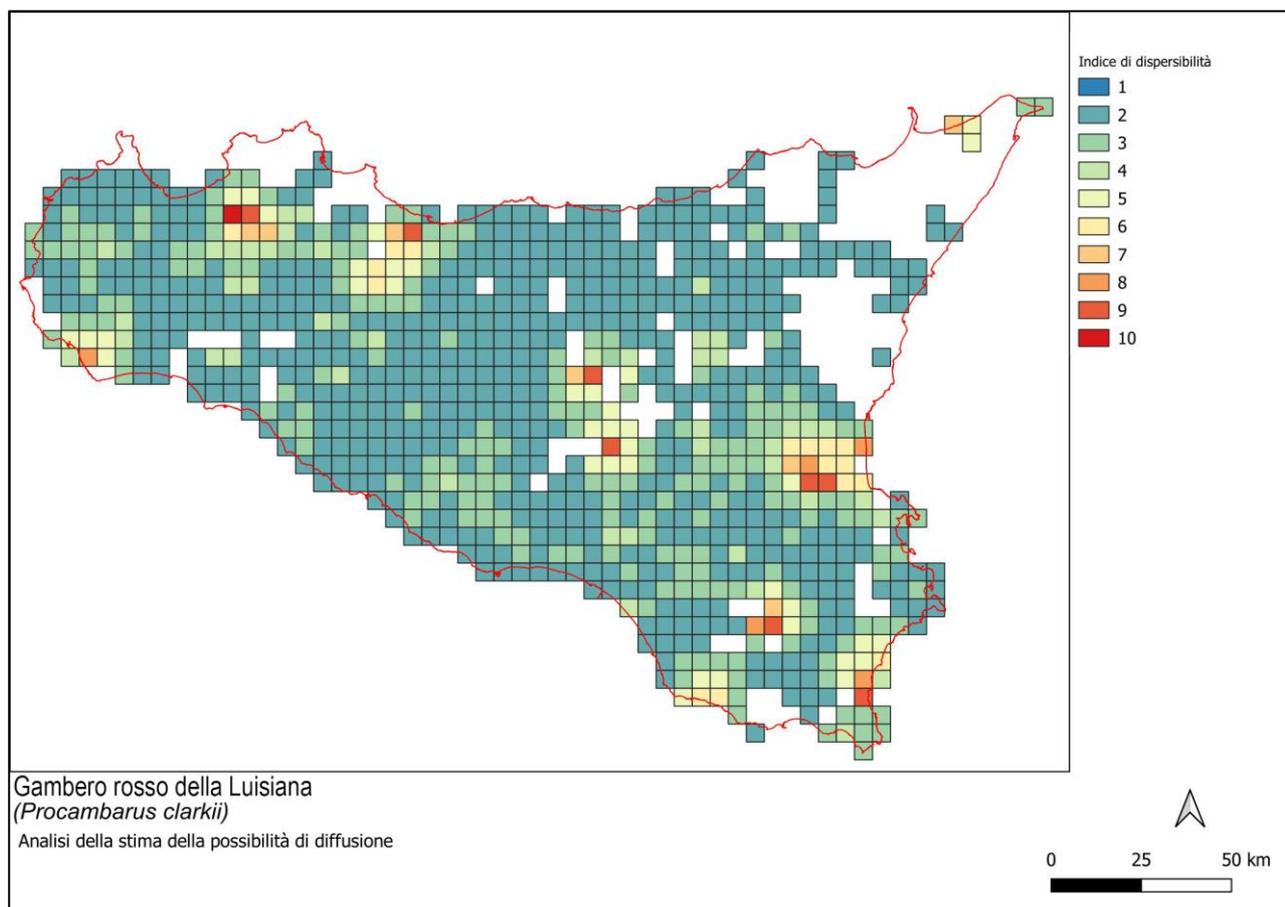
I dati di prossimità sono stati ulteriormente incrociati con quanto già elaborato, consentendo di realizzare la carta del rischio, inteso come stima della probabilità che la specie aliena invasiva possa cagionare danno ad habitat e specie di interesse conservazionistico. I valori numerici ottenuti dal prodotto tra l'indice di sensibilità precedentemente ottenuto e l'indice di prossimità sono stati classificati secondo il criterio di Jenks (minima varianza) e riportati in 6 categorie di rischio: molto basso, basso, medio, medio/alto, alto, molto alto.



Carta del rischio, inteso come stima della probabilità che il gambero rosso della Luisiana possa cagionare danno ad habitat e specie di interesse conservazionistico

Per completezza è stata realizzata una carta che, senza prendere in considerazione la vulnerabilità nei confronti della presenza di habitat di interesse conservazionistico, incrocia le informazioni di presenza certa riscontrata nella campagna di monitoraggio con le informazioni relative alla idoneità potenziale per la specie aliena invasiva, indicando, in una scala di valori a 10

classi, sempre categorizzati con il metodo di Jenks, la maggiore o minore probabilità di colonizzazione a partire dalle popolazioni già esistenti (indice di disperdibilità).



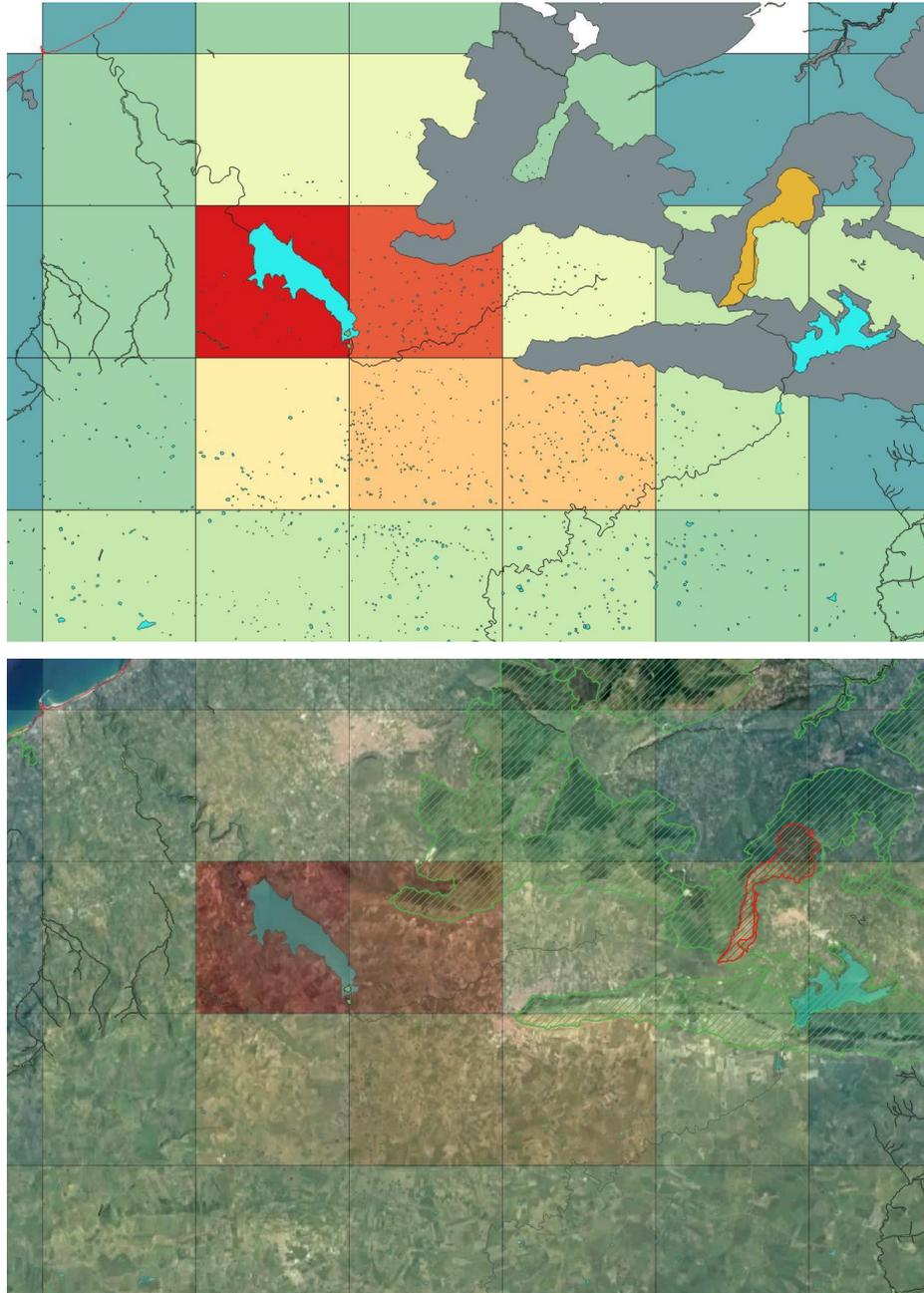
Indice di dispersibilità, inteso come stima della capacità diffusiva naturale del gambero rosso della Luisiana a partire dai siti di presenza nota

Individuazione di aree di intervento prioritario

Le analisi geografiche condotte fino a questo punto rappresentano lo strumento di base per la pianificazione di interventi di monitoraggio, contenimento ed eradicazione del gambero rosso della Luisiana sul territorio siciliano. In fase di pianificazione degli interventi è infatti possibile consultare uno degli strati informativi ottenuti (superficie idrica/idoneità, vulnerabilità, rischio, dispersibilità) ed eventualmente sovrapporlo allo strato delle aree protette, per prioritizzare gli interventi in funzione degli obiettivi di questi ultimi.

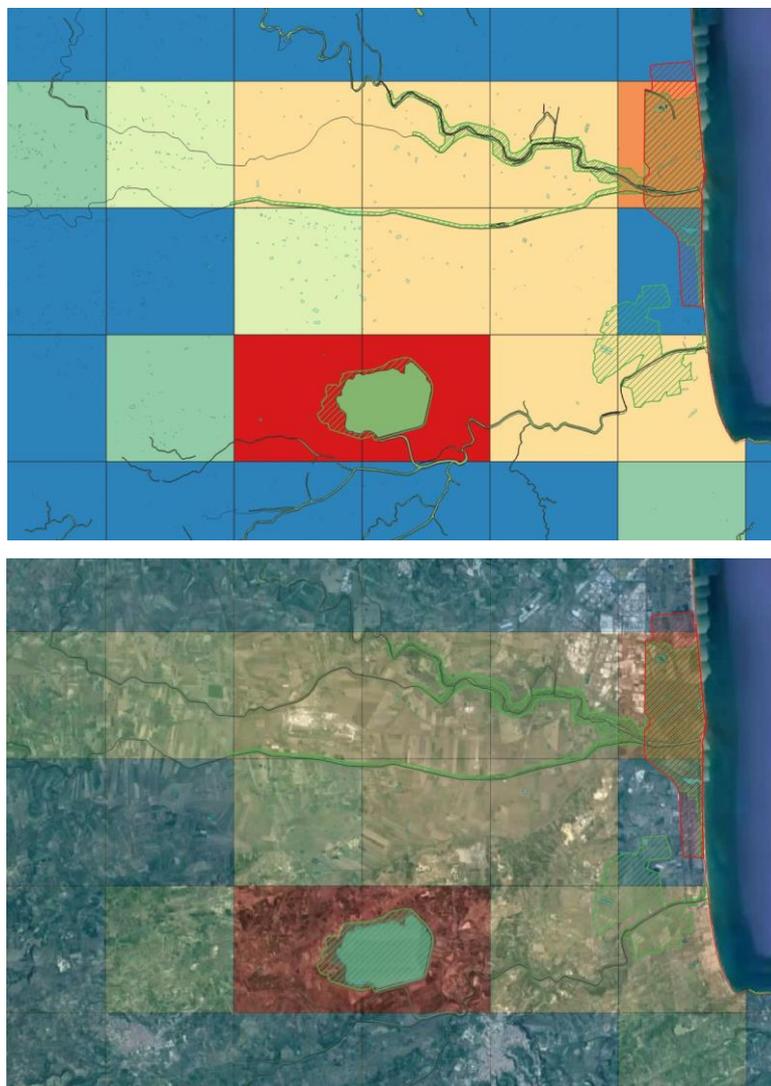
Per gli interventi di monitoraggio e verifica della presenza o dell'espansione della specie può essere utile utilizzare come strato informativo di base la mappa della dispersione naturale potenziale, sovrapponendo lo strato relativo alla presenza delle superfici idriche ed eventualmente delle aree

protette. Ad esempio, è possibile verificare come i numerosi stagni agricoli ad est e a sud del lago Poma (Provincia di Palermo) risultano essere soggetti a probabile colonizzazione da parte del gambero rosso della Luisiana e pertanto uno sforzo di campionamento in quest'area sarebbe auspicabile. In questo caso l'intervento è finalizzato solo parzialmente alla tutela di habitat sensibili, quanto piuttosto a verificare l'espansione areale della specie. Si nota comunque come l'eventuale espansione verso est andrebbe a minacciare le aree protette presenti.



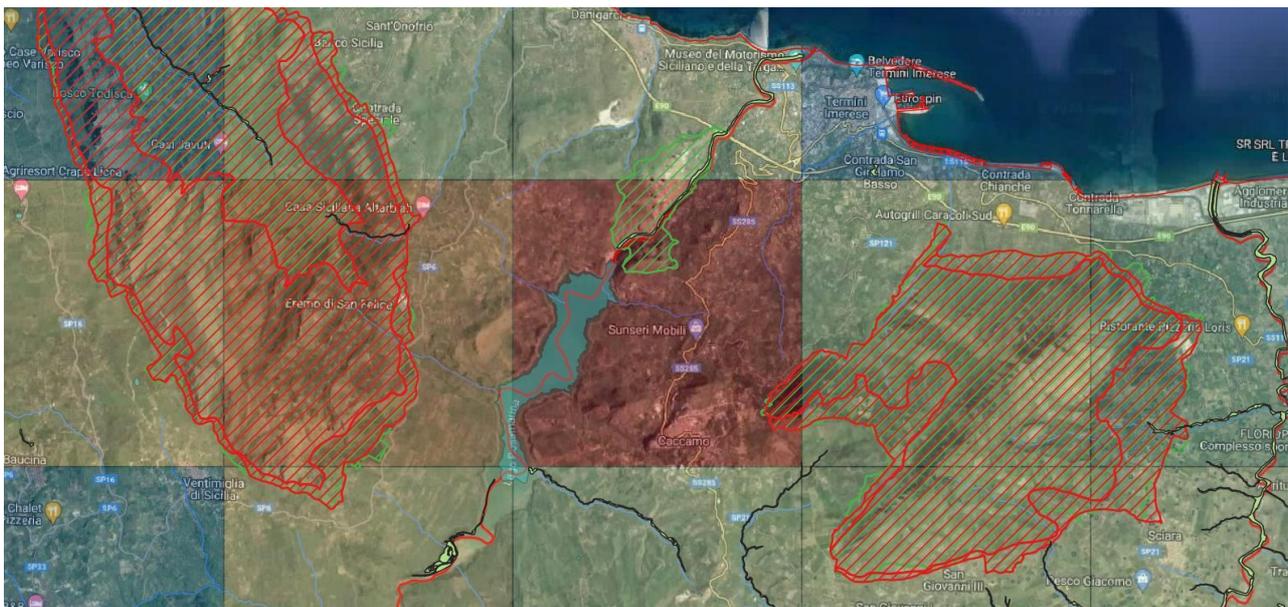
Rappresentazione cartografica dell'individuazione di aree di probabile espansione del gambero rosso della Luisiana (contesto del Lago Poma).

Se gli interventi sono mirati al controllo/eradicazione in contesi considerati sensibili per la presenza di specie e habitat di interesse conservazionistico, è opportuno utilizzare come livello informativo di base la carta del rischio, sovrapponendo i poligoni delle aree protette e degli habitat di interesse conservazionistico. Ad esempio, appare prioritario il controllo della specie nell'area della Piana di Catania e nel bacino del Fiume Simeto, ricco di contesti idonei alla specie aliena e al contempo di pregevoli contesti ambientali inclusi all'interno della Riserva Naturale Oasi del Simeto (habitat 3280), all'interno del sito Natura 2000 ITA070001 (Foce del Fiume Simeto e Lago di Gornalunga) interessati da habitat 3280 e 92D0, gli habitat 3150 del Lago Biviere di Lentini (ITA070029), e ancora gli habitat 3280 del Fiume San Leonardo, sempre nel contesto del sito ITA070029.



Rappresentazione cartografica dell'individuazione di aree particolarmente vulnerabili alla presenza del gambero rosso della Luisiana dove gli interventi di controllo si rendono prioritari (contesto del Fiume Simeto).

Analogo esempio si evidenzia nel contesto del Lago Rosamarina (PA) in cui la presenza della specie aliena invasiva minaccia gli ambiti naturalistici interessati dalla presenza di habitat 3290, 3250 e 92D0 presenti sia a nord sia a sud dell'invaso, e in parte inclusi all'interno del sito Natura 2000 ITA020043.



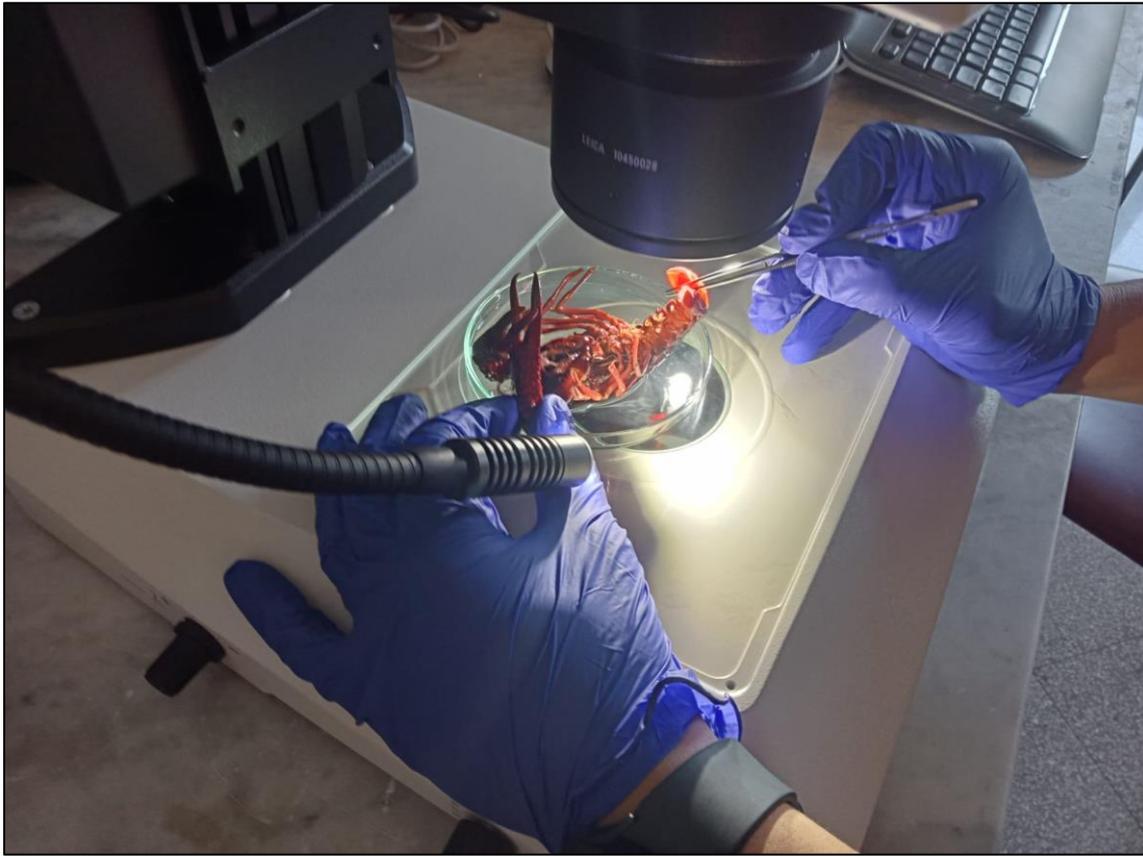
Rappresentazione cartografica dell'individuazione di aree particolarmente vulnerabili alla presenza del gambero rosso della Luisiana dove gli interventi di controllo si rendono prioritari (contesto dell'invaso Rosamarina).

In conclusione, lo strumento di analisi realizzato, grazie all'elaborazione degli strati informativi geografici della Regione Siciliana e alle informazioni di distribuzione del gambero rosso della Luisiana ottenute in ambito del presente progetto, consentono di rendere più agevole ed efficace la pianificazione degli interventi futuri sul contenimento ed eradicazione locale della specie aliena invasiva. Va certamente tenuto conto del fatto che il modello è frutto di semplificazioni e approssimazioni dettate dalla complessa natura dei dati ecologici di partenza, e dell'ampiezza del territorio analizzato. Va però aggiunto che il modello può essere facilmente modificato e aggiornato in funzione di nuove informazioni raccolte e del miglioramento della precisione dei dati geografici, consentendo così la progressiva ottimizzazione delle azioni di tutela delle specie e degli habitat minacciati dalla presenza del gambero rosso della Luisiana.

WP5: Analisi della presenza di infezioni fungine in popolazioni selezionate

In Sicilia, la presenza della peste del gambero in acque pubbliche non è stata ancora accertata, benché osservazioni preliminari e dati inediti ne suggeriscano la potenziale presenza (cf. Marino et al., 2014). Alla luce dell'impatto potenziale di questi funghi patogeni sulla fauna autoctona siciliana, reperire dati sulla presenza e distribuzione di questi patogeni nelle acque regionali è di primaria importanza per la corretta pianificazione di desiderabili misure di contenimento degli stessi. Priorità del WP5 è stata quindi quella di verificare l'eventuale presenza dei funghi patogeni appartenenti al genere *Aphanomyces*, noti per essere ben tollerati dal gambero della Luisiana, che potrebbe fungere da vettore di dispersione nei confronti della fauna autoctona.

Negli esemplari campionati e osservati in laboratorio (cf. gli esiti del WP1 per una lista dei siti di rinvenimento della specie), non è stata riscontrata la presenza di sintomi propri della peste del gambero (vedi Aquiloni et al., 2011; Martín-Torrijos et al., 2018 per una descrizione dei caratteri diagnostici della presenza di fenomeni infettivi). Per tale motivo, ad oggi non è stato necessario lo svolgimento di analisi molecolari di conferma e caratterizzazione della presenza di infezioni da *Aphanomyces*. Ciononostante, un monitoraggio continuo dei corpi idrici siciliani in cui è stata rinvenuta la specie è di fondamentale importanza, in modo tale da poter tempestivamente intervenire nel caso in cui la peste del gambero si manifestasse a seguito di nuove introduzioni, tenendo a mente che questa infezione potrebbe colpire la fauna nativa dell'isola.



Ricerca di evidenze di segni di presenza di infezioni fungine

WP6: Linee guida per la gestione di *Procambarus clarkii* in Sicilia

Obiettivo di questo *work package* è fornire indicazioni e linee guida relative alle attività che possono essere intraprese a contrasto della diffusione del gambero rosso della Luisiana nella Regione Sicilia.

Normativa vigente

La specie è presente nell'elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale inserite nel Regolamento UE 1143/2014 del Parlamento Europeo e del Consiglio, recante disposizioni volte a prevenire e gestire l'introduzione e la diffusione delle specie esotiche invasive che impone agli Stati Membri l'eradicazione rapida o il controllo di tali specie. In particolare, la specie è presente nel primo elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale adottato dalla Commissione il 13 luglio 2016 in applicazione del regolamento sopracitato (Regolamento di esecuzione UE 1141/2016). L'inclusione nell'elenco comporta che la specie, oltre alla gestione obbligatoria, non possa essere commerciata, detenuta, allevata, trasportata e rilasciata (art. 7).

Il Regolamento UE 1143/2014 è stato recepito attraverso l'adeguamento della normativa nazionale con il Decreto Legislativo 230 del 15 dicembre 2017. L'art.19, comma 2 e l'art. 22, comma 2 del D.lgs 230/2017, riconoscono le misure di eradicazione e gestione del piano nazionale di gestione della specie (approvato dal decreto del MASE il 31/05/2023)¹ quali misure connesse e necessarie al mantenimento in uno stato di conservazione soddisfacente delle specie e degli habitat (D.P.R. 357/1997 e successive modifiche), e per la loro finalità, non richiedono di essere assoggettati a Valutazione di Incidenza, in linea con i disposti dell'art. 6, paragrafo 3, della Direttiva "Habitat" e dell'articolo 5 del D.P.R. 357/97.

Il piano nazionale e le sue misure di eradicazione e gestione non sono assoggettate a procedura di VAS (Valutazione Ambientale Strategica), in quanto non compresi tra i piani specificatamente individuati ai sensi dell'art. 6, comma 2, lett. a) del D.Lgs. 152/2006 e s.m.i.; inoltre, in quanto direttamente connessi alla gestione dei siti Natura 2000, non sono ricadenti nella fattispecie prevista dal medesimo articolo 6, comma 2, lett b), ovvero piani per i quali, in considerazione dei possibili

1

https://www.mase.gov.it/sites/default/files/archivio/allegati/biodiversita/decr_appr_piano_gest_gambero_louisiana.pdf

https://www.mase.gov.it/sites/default/files/archivio/allegati/biodiversita/decr_appr_piano_gest_gambero_louisiana.pdf

impatti sulle finalità di conservazione dei siti designati come ZPS o ZSC si ritiene necessaria una valutazione d'incidenza ai sensi dell'articolo 5 del DPR 357/97.

Il D.Lgs 230/2017 prevede agli artt. 19 e 22 che le Regioni, le Province autonome di Trento e Bolzano e gli enti gestori delle aree protette nazionali applichino le misure di eradicazione rapida (Art. 19) e di gestione (art. 22). Tali Autorità competenti applicano le misure di eradicazione e di gestione avvalendosi, se del caso, della collaborazione di altre amministrazioni, che devono svolgere le attività con le risorse disponibili a legislazione vigente nei propri bilanci, o di soggetti privati. Dell'applicazione delle misure e dei risultati conseguiti nel corso delle attività è informato il MASE che deve rendicontare alla Commissione Europea sullo stato delle specie di interesse unionale ogni 6 anni (art. 24 del Regolamento EU 1143/2014).

Sorveglianza e monitoraggio

È possibile sorvegliare e monitorare la presenza della specie, valutando eventuali segni di presenza (chele, pezzi di esoscheletro, tane; talvolta è possibile avvistare anche individui dentro e fuori dall'acqua) e posizionando nasse armate con esca trofica. Ci si può avvalere dell'utilizzo del DNA ambientale, soprattutto per la sorveglianza, dal momento che questa tecnica rileva la specie anche a basse densità, quando le tecniche di trappolaggio possono essere meno efficaci. In alcuni casi, ove il livello dell'acqua lo rende possibile, si può utilizzare anche un guadino per effettuare un campionamento manuale. Il contributo dei cittadini può rivelarsi molto importante per la sorveglianza e il rilevamento precoce e in generale per acquisire dati in merito alla presenza della specie sul territorio attraverso varie app o piattaforme che possono essere utilizzate allo scopo (ad esempio, "Invasive Alien Species Europe" sviluppata a livello europeo da EASIN, iNaturalist).

Gestione

Esistono numerose tecniche per contenere e controllare la specie una volta presente sul territorio. Nel pianificare le attività gestionali bisogna considerare che i metodi utilizzati siano efficaci per ottenere un controllo della popolazione della specie in questione, tenendo in debita considerazione la salute umana e la tutela degli ecosistemi, con particolare riferimento alle specie non-target delle misure di gestione e i loro habitat. Si raccomanda un approccio integrato per raggiungere dei buoni risultati, dal momento che non esiste un unico metodo efficace applicabile ovunque, che i metodi di controllo noti non sono sempre utilizzabili in tutte le situazioni di intervento e che spesso vanno a

colpire stadi vitali differenti: è necessario utilizzare, quindi, più metodi insieme per raggiungere gli obiettivi di controllo programmati (Gherardi et al. 2011; Manfrin et al. 2019).

I vari metodi al momento disponibili sono elencati nel piano di gestione nazionale e sono: 1) cattura con nasse con maglie di dimensioni differenti/ART (Artificial Refuge Traps) e successiva soppressione; 2) controllo biologico attraverso l'utilizzo di predatori nativi; 3) sterilizzazione; 4) metodi fisici (disseccamento di un corpo idrico); 5) utilizzo di biocidi (Pyblast). Quest'ultimo metodo non è in generale applicabile in Italia. Altri metodi sono stati sperimentati in condizioni controllate (popolazioni monosex, silenziamento di ormoni chiave attraverso RNA interference, somministrazione orale di ormoni peptidici), senza, però, essere stati ancora applicati sul campo per il controllo della specie.

Piano di controllo/eradicazione di *P. clarkii* in Sicilia

Nel piano nazionale di gestione della specie sono riportati gli obiettivi gestionali per ogni regione e per la regione Sicilia vengono indicati il monitoraggio e il controllo/contenimento. Alla luce dei risultati ottenuti dai campionamenti svolti nel presente progetto, si confermano la presenza della specie in Sicilia (con nuove segnalazioni) e gli obiettivi gestionali indicati nel piano nazionale. Per il piano di gestione regionale vengono, quindi, ripresi tali obiettivi.

Devono essere previste attività di sorveglianza, monitoraggio e controllo della specie. Sarebbe necessario istituire un sistema di sorveglianza (ai sensi dell'art. 18 del D. Lgs. 230/2017) per confermarne la presenza o registrarne l'assenza e valutare la diffusione delle popolazioni già presenti in modo da poter intervenire tempestivamente in caso di nuove segnalazioni con popolazioni contenute e potenzialmente eradicabili. Come previsto dalle "Linee guida per la redazione dei programmi di monitoraggio delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale o nazionale" predisposte dal MASE, al fine di ottimizzare le risorse, il monitoraggio e la sorveglianza si avvalgono, quando possibile, delle strutture e delle reti di monitoraggio già esistenti sul territorio, come ad esempio quelle deputate all'attuazione dell'articolo 11 della direttiva 92/43/CEE ("Direttiva Habitat") e dell'articolo 8 della direttiva 2000/60/CE ("Direttiva Acque"). Ambiti prioritari per la realizzazione del monitoraggio sono le aree prospicienti i siti di possibile ingresso o diffusione (i.e. allevamenti, laghetti), le aree vocate particolarmente sensibili o vulnerabili (i.e. aree protette, siti Natura 2000).

Come precedentemente detto, anche il singolo cittadino può contribuire con segnalazioni attraverso app o foto. Infatti, i cittadini, informati tramite attività di educazione e sensibilizzazione alle tematiche delle specie aliene, possono rivelarsi un fondamentale strumento di individuazione di

eventuali nuclei della specie sul territorio; in passato, numerose nuove segnalazioni della specie sono arrivate proprio dai cittadini. Un costante monitoraggio dei principali social media e forum può rivelarsi molto utile per avere informazioni su nuove colonizzazioni, come accaduto in passato. È possibile pensare a un progetto dedicato sull'app iNaturalist o utilizzare l'app “Invasive Alien Species Europe” che raccoglie i dati di presenza delle specie di rilevanza unionale; nel caso si utilizzi iNaturalist, i dati possono confluire poi nell'app europea. Si potrebbe anche istituire un indirizzo email a cui i cittadini mandano le segnalazioni. In caso di nuove segnalazioni, bisogna verificarne la veridicità e l'attendibilità, soprattutto quando la segnalazione riguarda aree in cui la presenza delle specie non è nota. Si deve procedere con sopralluogo, se necessario, e il posizionamento di nasse armate con esca trofica. Come sopra riportato, ci si può avvalere anche dell'utilizzo delle indagini basate sulla tecnica del DNA ambientale. Qualora la presenza venga confermata, è indispensabile effettuare prima un monitoraggio della popolazione per capirne la reale dimensione e struttura, per poi decidere se un'eradicazione sia ancora possibile oppure no.

Essendo *P. clarkii* già presente sul territorio siciliano e di difficile gestione, non è ragionevole ipotizzare azioni di contrasto ovunque. Attraverso il lavoro di prioritizzazione svolto nel WP4, sono state individuate le aree dove è importante prevenire la diffusione della specie e/o portare avanti un'azione di controllo a difesa degli ecosistemi da tutelare. Una volta individuate le aree, è necessario verificare la fattibilità e le ricadute di un possibile intervento, selezionando i metodi migliori in base alle caratteristiche dell'area invasa e della popolazione presente. È fondamentale stilare un piano di azione comprensivo di tutte le varie fasi (sopralluogo e preparazione tecnica; selezione dei metodi da utilizzare tenendo conto degli effetti su specie non-target; pianificazione delle risorse umane ed economiche, e delle tempistiche necessarie; monitoraggio da condurre pre/durante e post intervento per valutare l'efficacia dell'intervento; mantenimento dei risultati ottenuti). L'eradicazione è molto difficile e possibile solo nelle fasi iniziali dell'invasione in corpi idrici confinati/chiusi. In situazioni diverse può risultare tecnicamente infattibile ed economicamente insostenibile: è, quindi, necessario considerare regolari attività di controllo, finalizzate ad abbassare la densità di popolazione e a mitigare gli impatti della specie o ancora a prevenirne la diffusione dentro aree protette dove non sia ancora presente. Come riportato precedentemente, per gli interventi di eradicazione/controllo è raccomandato un approccio integrato e adattativo, considerando i metodi disponibili e utilizzabili al momento (trappolaggio, controllo biologico, sterilizzazione, fisico). Solitamente si utilizza l'andamento del CPUE (Catch per Unit Effort) per monitorare l'efficacia degli interventi.



È importante la raccolta e l'analisi di tutti i dati disponibili, quali numero e caratteristiche degli animali catturati (sesso, taglia, stato riproduttivo) per valutare l'efficacia dei metodi di gestione ed eventualmente modificarli in corso. Bisogna produrre di volta in volta report sulle attività svolte, specificando lo sforzo e le modalità messe in atto, comunicando analisi e risultati ottenuti e garantendo così una sempre più completa e idonea linea di intervento e di gestione. In caso di eradicazione, il monitoraggio deve essere condotto anche dopo l'intervento per almeno 2-3 anni per essere sicuri del successo e della non reinvasione dell'area da parte della specie. Nella fase post eradicazione, può essere utile utilizzare il DNA ambientale a conferma del successo dell'intervento. Con cadenza annuale i risultati degli interventi effettuati sono valutati e rendicontati al MASE, secondo quanto previsto dall'art. 18.5 del D.Lgs 230/17. Pertanto, è importante raccogliere i dati di presenza aggiornati e di tutte le attività di controllo condotte per la rendicontazione ministeriale.

Azioni informative e divulgative

Per evitare l'ulteriore diffusione della specie in Sicilia e per coadiuvare le azioni di gestione, è necessario coinvolgere i cittadini, vari stakeholders (come pescatori, frequentatori e proprietari dei corpi idrici, acquariofili), figure professionali che lavorano sul territorio (ad esempio, naturalisti, biologi, tecnici ARPA) e le scuole per aumentare la consapevolezza degli impatti delle invasioni biologiche nelle acque interne in Sicilia attraverso eventi formativi e divulgativi.

Il singolo cittadino può essere parte attiva del contrasto al fenomeno in Sicilia: non solo può segnalare eventuali nuclei della specie sul territorio, ma può adottare comportamenti consapevoli e proattivi. In particolare, i fruitori delle aree acquatiche dovrebbero ricordarsi di pulire e disinfettare l'attrezzatura utilizzata per evitare la diffusione accidentale di specie aliene (frammenti, spore), incluse malattie importanti per la fauna autoctona. È importante divulgare i vari codici di condotta di buone pratiche (in particolare quello su animali da compagnia e pesca/nautica da diporto), già disponibili nella versione italiana (<https://specieinvasive.it/documenti-utili/codici-di-condotta-e-buone-pratiche>; <https://alien.jrc.ec.europa.eu/easin/BewareofAliens/AllPlatforms?lang=IT>) per favorire l'adozione di tali comportamenti consapevoli e aumentare la consapevolezza sul fenomeno.

Negli interventi per le figure professionali, è necessario dare una panoramica della problematica con un focus sulla situazione siciliana, ricordare le normative esistenti e infine sottolineare il ruolo che possono rivestire con la loro attività (segnalare la presenza, adottare e divulgare i codici di condotta, promuovere ulteriori eventi divulgativi per aumentare la consapevolezza sul problema). Negli interventi con il pubblico più generico, oltre a presentare la situazione siciliana sulle invasioni biologiche nelle acque interne e sulla specie oggetto del progetto, è fondamentale favorire i



Università
degli Studi
di Palermo



mipaaf
ministero delle politiche
agricole alimentari e forestali



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

comportamenti consapevoli riportati nei codici di condotta e la partecipazione alla raccolta dati attraverso app/email/piattaforme. È consigliabile organizzare anche interventi di *citizen science* sul campo, in particolare con le scuole e durante la primavera-estate, per imparare a riconoscere la specie e illustrare concretamente come fare una segnalazione. Infine, nei corpi idrici molto frequentati dai cittadini e nelle aree protette potrebbe essere utile installare una cartellonistica con le informazioni principali per riconoscere la specie e segnalarla.

WP7: Valorizzazione come risorsa alimentare e per l'integrazione in prodotti biotecnologici

Considerando le sue caratteristiche di elevata invasività, *Procambarus clarkii* dal 2016 è stato inserito nella lista delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale (G.U. L 189 del 14/7/2016), per le quali sia ai sensi del Regolamento UE 1143/14 che del Decreto Legislativo n. 230/17 sono previsti una serie di divieti e obblighi d'intervento, con l'obiettivo principale di impedire nuove introduzioni in natura e di controllare e contenere le invasioni nelle aree già colonizzate, così da limitare il più impossibile l'impatto sugli ecosistemi locali. A questo scopo la promozione dell'uso di *P. clarkii* per il consumo umano e per la produzione di integratori e mangimi zootecnici potrebbe rappresentare un'ottima strategia per il controllo della densità degli esemplari nei siti colonizzati, per la prevenzione della colonizzazione di nuove aree e, soprattutto, per lo smaltimento degli esemplari rimossi nell'ambito di azioni di monitoraggio, controllo ed eradicazione.

È noto che diverse specie di gamberi d'acqua dolce presentano importanti proprietà nutrizionali. Per esempio, *Cherax quadricarinatus*, *Macrobrachium rosenbergi*, e *Macrobrachium nipponense*, altre tre specie di gamberi d'acqua dolce notevolmente utilizzate in acquacoltura, presentano ottime caratteristiche nutrizionali, in quanto ricche in proteine, aminoacidi, carboidrati e lipidi. Inoltre questi crostacei presentano un'attività antiossidante notevole in quanto caratterizzati da un elevato contenuto di acidi grassi omega-3 e vitamine (Tee et al. 2022; Lavajoo et al. 2018). Considerando che in diversi paesi *P. clarkii* è notevolmente apprezzato per la prelibatezza delle sue carni, conoscere le proprietà nutrizionali delle popolazioni presenti in Sicilia diventa molto importante. In letteratura inoltre sono presenti vari studi in cui gamberi d'acqua dolce vengono usati non solo come risorsa dal punto di vista alimentare ma anche con potenzialità farmaceutiche, biotecnologiche e biomediche (Andreansyah & Ridwanto 2022; Nuc et al., 2023). Infatti *Procambarus clarkii* oltre alla porzione edibile costituita dal muscolo, presenta una porzione non edibile, il "waste", costituita dall'esoscheletro. Quest'ultima costituisce una frazione significativa rispetto al peso totale degli esemplari. Questa biomassa solitamente risulta difficile da smaltire causando ingenti spese per le aziende e soprattutto un impatto ambientale non indifferente, in quanto non risulta essere facilmente biodegradabile. In un'ottica di economia circolare, questo materiale di scarto potrebbe diventare un'importante risorsa, come sorgente di molecole bioattive, quali chitosano e astaxantina, di cui notoriamente sono ricchi gli esoscheletri dei crostacei (Mauro et al., 2022).

Dall'esoscheletro di diversi crostacei è possibile estrarre la chitina (Shavandi et al. 2017; Bölgen et al. 2016; Mauro et al. 2022), un polisaccaride costituito da unità di N-acetilglucosammina

caratterizzate da un legame β -1,4 glicosidico, il secondo biopolimero più presente in natura dopo la cellulosa (Synowiecki & Al-Khateeb, 2000). Questa biomolecola però non può essere usata tal quale, in quanto non risulta essere né biocompatibile né biodegradabile. Per tale ragione è necessario deacetilare la chitina per ottenere un altro polisaccaride con molteplici applicazioni, il chitosano. Questo biopolimero viene usato nel trattamento delle acque reflue, sfruttando la sua capacità di chelare i cationi metallici (Al-Manhel et al. 2018); trova anche applicazioni nel settore agricolo, infatti grazie alle sue proprietà antimicrobiche permette di ridurre la quantità di pesticidi utilizzati nelle coltivazioni; nel settore biomedico questo biopolimero viene impiegato in bendaggi per accelerare la guarigione di ferite, infatti il chitosano presenta la capacità di promuovere l'adesione degli eritrociti e l'adsorbimento del fibrinogeno, di accelerare l'aggregazione e l'attivazione piastrinica, mostrando quindi buone proprietà emostatiche. In campo farmaceutico il chitosano viene utilizzato come eccipiente, sfruttando le sue proprietà filmogene, viscosizzanti, mucoadesive, inoltre può essere usato come carrier in forme di dosaggio a rilascio controllato per veicolare i farmaci direttamente al sito d'azione; viene anche usato come principio attivo, grazie alle sue proprietà antitumorali, antimicrobiche, antinfiammatorie e antiossidanti (Wang et al. 2020). Il chitosano presenta anche notevoli applicazioni nel campo alimentare, infatti è possibile creare dei film polimerici con proprietà antimicrobiche utilizzabili come packaging per la conservazione degli alimenti (Mauro et al. 2022).

L'altra biomolecola di considerevole interesse, estraibile dagli esoscheletri di diversi crostacei e non solo, è l'astaxantina, uno tra i più potenti antiossidanti naturali. Questa molecola non viene biosintetizzata nei crostacei ma in *Haematococcus pluvialis*, una microalga verde di cui questi si nutrono (Ranga Rao, 2011). L'astaxantina è un carotenoide, caratterizzato da una serie di doppi legami coniugati responsabili sia dell'elevata attività antiossidante, sia del suo caratteristico colore rosso intenso, infatti la colorazione rossa tipica di crostacei e pesci, come il salmone o la trota, è proprio dovuta alla presenza di questa molecola (Ambati et al. 2014). La sua attività antiossidante è sfruttata in cosmetica per la produzione di creme e lozioni *antiaging* e nella produzione di integratori e prodotti nutraceutici; inoltre, la Food and Drug Administration e la Commissione europea hanno approvato l'uso dell'astaxantina come additivo alimentare nei mangimi per animali e pesci (Pashkow et al. 2008; G.U. L 220 del 21.8.2015).

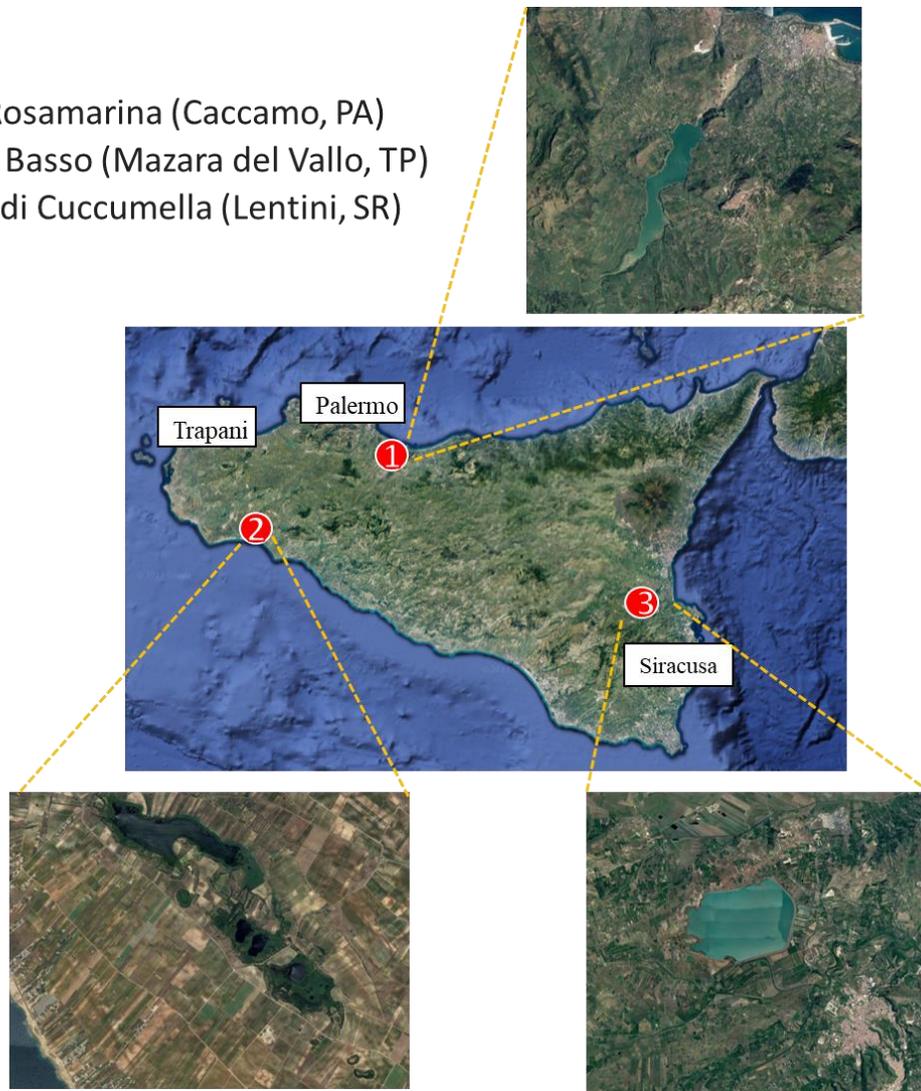
In base a tutte le considerazioni fatte precedentemente, gli obiettivi (WP7) del progetto “Censimento, caratterizzazione, controllo e valorizzazione del Gambero rosso della Luisiana (*Procambarus clarkii*) in Sicilia” sono stati così divisi:

WP7.1 Analisi per la determinazione della qualità delle carni del gambero:

WP7.2 Analisi per l'utilizzazione in prodotti biotecnologici

Per ognuno dei punti sopra elencati le analisi sono state effettuate su esemplari di *P. clarkii* campionati in tre siti di particolare interesse: Lago Rosamarina, Lago Gorgi Tondi e Risaie di Cuccumella. Ciò al fine di valutare eventuali differenze tra esemplari presenti in aree diverse, sia in termini di qualità delle carni che di resa e qualità di molecole bioattive. Queste possibili difformità potrebbero derivare dal diverso habitat, quindi diversa alimentazione, diversa esposizione a fattori esterni e diverse abitudini degli animali.

- 1) Lago Rosamarina (Caccamo, PA)
- 2) Gorgo Basso (Mazara del Vallo, TP)
- 3) Risaie di Cuccumella (Lentini, SR)



*I siti di campionamento di *P. clarkii* utilizzati per le analisi.*

WP7.1 Analisi per la determinazione della qualità delle carni

WP7.1a: Analisi per valutare la qualità delle carni e determinazione delle componenti nutrizionali

I campioni di muscolo dagli esemplari di *Procambarus clarkii* dei diversi siti sono stati prelevati con l'ausilio di bisturi e forbici monouso e sterili per evitare eventuali contaminazioni. Ogni muscolo è stato ripulito dai visceri, pesato in modo da ottenere il peso umido e congelato a -80°C per essere liofilizzato. Al termine della liofilizzazione il muscolo secco è stato nuovamente pesato per ottenere i valori di peso secco e calcolare i livelli di umidità. Dopo di ciò per ogni sito di campionamento sono stati formati pool di 15g di muscolo secco, in triplicato, per procedere alla determinazione della composizione nutrizionale. Sono stati valutati i livelli di umidità, proteine grezze, lipidi e ceneri; tali analisi sono state svolte secondo le procedure dell'Association of Official Analytical Chemists (AOAC International, 2012).



A sinistra: peso totale di esemplare di *P. clarkii*; a destra: muscolo di *P. clarkii* dopo liofilizzazione

Le carni dei *P. clarkii* dei tre siti esaminati (Lago Gorgi tondi, Lago Rosamarina, Risaie di Cuccumella) hanno mostrato buone proprietà nutrizionali. In particolare, è stato evidenziato un soddisfacente contenuto proteico e un basso contenuto lipidico. Per nessuno dei valori nutrizionali

esaminati sono state osservate differenze significative tra i campioni provenienti dai tre siti. I risultati relativi alla composizione nutrizionale sono riassunti in tabella.

	<i>P. clarkii</i> Rosamarina	<i>P. clarkii</i> Gorghi Tondi	<i>P. clarkii</i> Cuccumella
Proteine (%)	13.18±0.03 ^a	13.17±0.04 ^a	12.78±0.24 ^a
Lipidi (%)	0.33±0.02 ^b	0.34±0.03 ^b	0.38±0.01 ^b
Ceneri (%)	0.91±0.01 ^c	0.88±0.02 ^c	0.92±0.01 ^c
Umidità (%)	85.56±0.06 ^d	85.60±0.03 ^d	85.89±0.22 ^d

Composizione chimica (g/100g) dei muscoli di P. clarkii prelevati da tre siti. I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

Considerando che i valori nutrizionali oltre ad essere specie-dipendenti variano in base a molti fattori come: alimentazione, habitat, stagione, sesso e taglia degli esemplari (Nargis, 2006), in un'ottica di sfruttamento dei *Procambarus clarkii* presenti in Sicilia per uso alimentare umano, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli riportati da altri autori su esemplari della stessa specie ma di località geografiche diverse, sia allevati che catturati in natura (Zhang et al., 2023; Li et al. 2021). I valori ottenuti sono stati confrontati anche con quelli di altre specie di crostacei comunemente utilizzati ai fini alimentari umani, come *Faxonius limosus* (mietana et al., 2020), *Cherax destructor* e *Cherax quadricarinatus*, *A. foliacea* (Soultani et al., 2016), *Parapenaeus longirostris* (Soultani et al., 2016; Rosa & Nunes, 2004), *Aristeus Antennatus* (Rosa & Nunes, 2004), *Nephrops norvegicus* (Rosa & Nunes, 2004), *Callinectes sapidus* (Gökođlu & Yerlikaya, 2003; Ayas, 2016), *Portunus segnis* (Ayas, 2016), *Portunus pelagicus* (Gökođlu & Yerlikaya, 2003), *Homarus gammarus* e *Homarus americanus* (Barrento et al., 2009).

Per quanto riguarda la componente proteica, nei nostri campioni è stato osservato un contenuto proteico medio del 13,04%. Il campione che presenta il risultato migliore è stato quello proveniente dal Lago Rosamarina (13,18%), seguito dai campioni del Lago Gorghi Tondi e delle Risaie di Cuccumella (rispettivamente 13,17% e 12,78%). I valori osservati sono risultati simili ai livelli proteici presenti nei *P. clarkii* catturati in natura (Zhang et al., 2023), mentre sono risultati lievemente inferiori rispetto ai livelli proteici dei *P. clarkii* allevati (Zhang et al., 2023; Li et al. 2021) e ai livelli

presenti in tutte le altre specie sopra menzionate (mietana et al., 2020; Soultani et al., 2016; Rosa & Nunes, 2004; Gökođlu & Yerlikaya, 2003; Ayas, 2016; Barrento et al., 2009).

Il contenuto lipidico medio valutato nei nostri campioni è risultato pari allo 0,35%. Il campione di muscolo con il valore più elevato è stato quello delle Risaie di Cuccumella (0,38%) mentre il campione del Lago Rosamarina è stato quello che ha presentato i livelli lipidici più bassi (0,33%). I nostri risultati sono molto simili a quelli riportati da Zhang et al., (2023) sui *P. clarkii* catturati in natura e a quelli di *Cherax destructor* e *Cherax quadricarinatus* (Mauro et al., *submitted*). Inoltre i valori riscontrati sono risultati a quelli riportati in letteratura per altre specie di crostacei: *Faxonius limosus* (Smietana et al., 2020), *Aristaeomorpha foliacea* (Soultani et al., 2016), *Parapenaeus longirostris* (Soultani et al., 2016; Rosa & Nunes, 2004), *Aristeus antennatus* (Rosa & Nunes, 2004), *Nephrops norvegicus* (Rosa & Nunes, 2004), *Homarus gammarus* (Barrento et al., 2009). Nonostante questo, sono risultati inferiori ai livelli lipidici presenti in *P. clarkii* allevati (Zhang et al., 2023; Li et al. 2021), *Callinectes sapidus* (Gökođlu & Yerlikaya, 2003; Ayas, 2016), *Portunus segnis* (Ayas, 2016), *Portunus pelagicus* (Gökođlu & Yerlikaya, 2003) e *Homarus americanus* (Barrento et al., 2009).

In merito alle ceneri, sui nostri campioni è stato ottenuto un valore medio dello 0.90%. Per tutti e tre i siti sono stati ottenuti valori molto simili tra loro: 0,91% 0,88% 0,92% rispettivamente per i siti di Lago Rosamarina, Lago Gorgi Tondi e Risaie di Cuccumella. Valori analoghi e leggermente superiori sono riportati in letteratura sulle carni di altre specie sia di acqua dolce che salata (Smietana et al., 2020; Soultani et al., 2016; Rosa & Nunes, 2004; Gökođlu & Yerlikaya, 2003; Ayas, 2016; Barrento et al., 2009). Per quanto riguarda la percentuale di umidità sui nostri campioni è stata osservato un valore medio del 85,68%, risultato leggermente superiore rispetto ai valori presenti in letteratura per altre specie (Smietana et al., 2020; Soultani et al., 2016; Rosa & Nunes, 2004; Gökođlu & Yerlikaya, 2003; Ayas, 2016; Barrento et al., 2009).

In definitiva, i risultati ottenuti sulle qualità dei *P. clarkii* presenti in Sicilia appaiono promettenti. Infatti, sebbene i nostri campioni mostrino un contenuto proteico leggermente inferiore rispetto alle fonti proteiche comuni come pesce magro (Pleadin et al., 2017), pollame, suino e bovino (Ahmad et al. 2018), è interessante notare che essi presentano invece una percentuale lipidica considerevolmente inferiore. Queste caratteristiche potrebbero essere un punto di forza, soprattutto considerando l'importanza di mantenere un equilibrio tra proteine e grassi nella dieta. Inoltre, i contenuti di minerali e livelli di umidità che sono indicativi della qualità delle carni sono risultati molto soddisfacenti. Tale constatazione suggerisce che il gambero rosso della Louisiana potrebbe

rappresentare una valida alternativa alimentare, in grado di competere in termini di valore nutrizionale con altre fonti alimentari tradizionalmente consumate dagli esseri umani.

WP7.1b: Analisi per la presenza di contaminanti

A fronte del significativo impatto causato dell'inquinamento derivante dalle attività antropiche, si rendono sempre più necessarie valutazioni sullo stato di contaminazione di matrici ambientali ed alimentari. Le indagini chimiche sulle matrici biologiche e ambientali coinvolgono un ampio spettro di interessi; ad esempio, le analisi quali-quantitative degli inquinanti su specie aliene, quali il gambero rosso della Louisiana, possono anche fornire informazioni utili sulla qualità dell'ambiente grazie alle loro caratteristiche che li rendono strumenti potenti e sensibili di biomonitoraggio e quindi degli ottimi bioindicatori (bioaccumulatori/bioconcentratori). Infatti, tali organismi accumulano (attraverso tutte le vie di esposizione) contaminanti nei loro tessuti a un livello superiore rispetto a quello del mezzo in cui vivono e possono rappresentare delle vere e proprie "sentinelle ambientali".

Tutti i campioni da sottoporre alle analisi sono stati prelevati nel mese di luglio, durante il quale sono stati registrati anche i dati di alcuni parametri chimici fisici dell'acqua, come temperatura, pH, ecc. (vedi Tab.S1 Materiale supplementare). Il regime idrologico dei punti di campionamento dipende fortemente dalle precipitazioni, nel mese di luglio è stata registrata assenza di precipitazioni e le condizioni meteorologiche erano stabili. Da ciascuno di questi siti sono stati catturati un numero significativo di individui mediante nasse dotate di esca. Una volta raccolti, gli esemplari di *P. clarkii* sono stati immediatamente trasportati in laboratorio in ghiacciaie refrigerate.

Allo stesso tempo, da ciascun sito, sono stati scelti tre punti di prelievo (ad una distanza di 50 m l'uno dall'altro) da cui sono stati raccolti tre campioni di acqua (500 mL ciascuno) e tre campioni di sedimento (500 g ciascuno), trasportati refrigerati in laboratorio e conservati a 4 °C.

Tutti i campioni sono stati conservati in contenitori di plastica nuovi e sterili in polipropilene, ad eccezione dei campioni per le analisi degli ftalati che erano in vetro. Nel caso specifico di campioni di acqua e sedimenti, i contenitori sono stati precedentemente lavati con la stessa acqua di lago di campionamento.

Gli esemplari di *P. clarkii* sono stati conservati a - 20 °C prima di effettuare le misurazioni biometriche e successive dissezioni finalizzate al campionamento delle matrici organiche (muscolo ed esoscheletro) per la preparazione dei campioni da analizzare. In totale sono stati dissezionati 464 esemplari: 88 individui provenivano dal Lago Rosamarina, 144 individui da Gorgo Basso e 231 dalle risaie di Cuccumella. Gli analiti selezionati per la determinazione di possibili contaminazioni nelle

matrici di interesse sono stati: metalli pesanti, pesticidi, sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS), esteri dell'acido ftalico o ftalati (PAEs), antibiotici e cianotossine.

Nel progetto sono coinvolti a vario titolo diversi enti e sono state utilizzate diverse strumentazioni in base al tipo di analita indagato, tra queste, per la determinazione di antibiotici, pesticidi, PFAS, PAEs e cianotossine sono state utilizzate tecniche cromatografiche come la cromatografia liquida ad alta prestazione-spettrometria di massa, (HPLC-MS) e la gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). Relativamente agli elementi in traccia e i metalli le analisi sono state effettuate attraverso spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). I quattro enti coinvolti sono: l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Sicilia (ARPA), l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia (IZS), la Chimica Applicata Depurazione Acque s.n.c. di Filippo Giglio e C. (CADA) di Menfi (AG) e la Fondazione Edmund Mach (FEM) di San Michele all'Adige (TN). Questi hanno collaborato alla determinazione degli inquinanti attraverso l'applicazione di protocolli e tecniche analitiche standardizzate riportati in tabella.

Inquinanti	Matrice	Estrazione	Metodi/Protocolli	Tecnica analitica	Ente
Metalli pesanti	Acqua	Analisi diretta	EPA 200.8 + EPA		
	Muscolo ed esoscheletro	Digestione acida	6020b + EPA3052	Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)	ARPA
	Sedimento				
Antibiotici	Muscolo	Estrazione solido - liquido	Decision EC 657/2002	Cromatografia liquida / spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)	IZS
Pesticidi	Acqua	Estrazione liquido-liquido	EPA 3510C 1996 + EPA 8270E 2018	Gascromatografia/spettrometria di massa (GC-MS)	CADA
	Sedimento	Estrazione Soxhlet automatizzata, ultrasonic extraction	EPA 3541 1994 + EPA 3630C 1996 + EPA 8081B 2007	LC-MS/MS	
	Muscolo	Quick, Easy, Cheap, Effective,	UNI EN 15662:2018	GC-MS / LC-MS	

		Rugged and Safe (QuEChERS)			
PFAS	Acqua	Estrazione in fase solida	ISO 21675:2019	LC-MS/MS	CADA
	Sedimenti	Estrazione con solvente su microscala,	EPA 3570 2002 + EPA 3550C 2007 + EPA 8321B 2007		
	Muscolo	ultrasonic extraction	MPI 268 2023 Rev.0		
Ftalati	Acqua	Estrazione liquido-liquido	EPA 3510C 1996 + EPA 8270E 2018	GC-MS	CADA
	Sedimenti	Estrazione soxhlet automatizzata,	EPA 3541 1994 + EPA 3620C 2014 + EPA 8270E 2018		
	Muscolo	florisil cleanup	EPA 3541 1994 + EPA 3620C 2014 + EPA 8270E 2018		
Cianotossine	Muscolo	Estrazione solido – liquido, ultrasonic extraction	Cerasino & Salmaso (2020)	LC-MS/MS	FEM

Metodi e tecniche analitiche utilizzate per la determinazione degli inquinanti in matrici biologiche ed ambientali ed enti coinvolti per le analisi

Dopo la cattura e il trasporto in laboratorio, di tutti gli individui sono stati presi i dati sul peso totale e sul peso di muscolo fresco, sesso e maturità sessuale, presenza di *glair glands*, lunghezza totale, lunghezza e larghezza del cefalotorace, lunghezza e larghezza delle chele destra e sinistra e larghezza dell'addome (vedi Fig. 2 e Tab. S2 in Materiale supplementare).



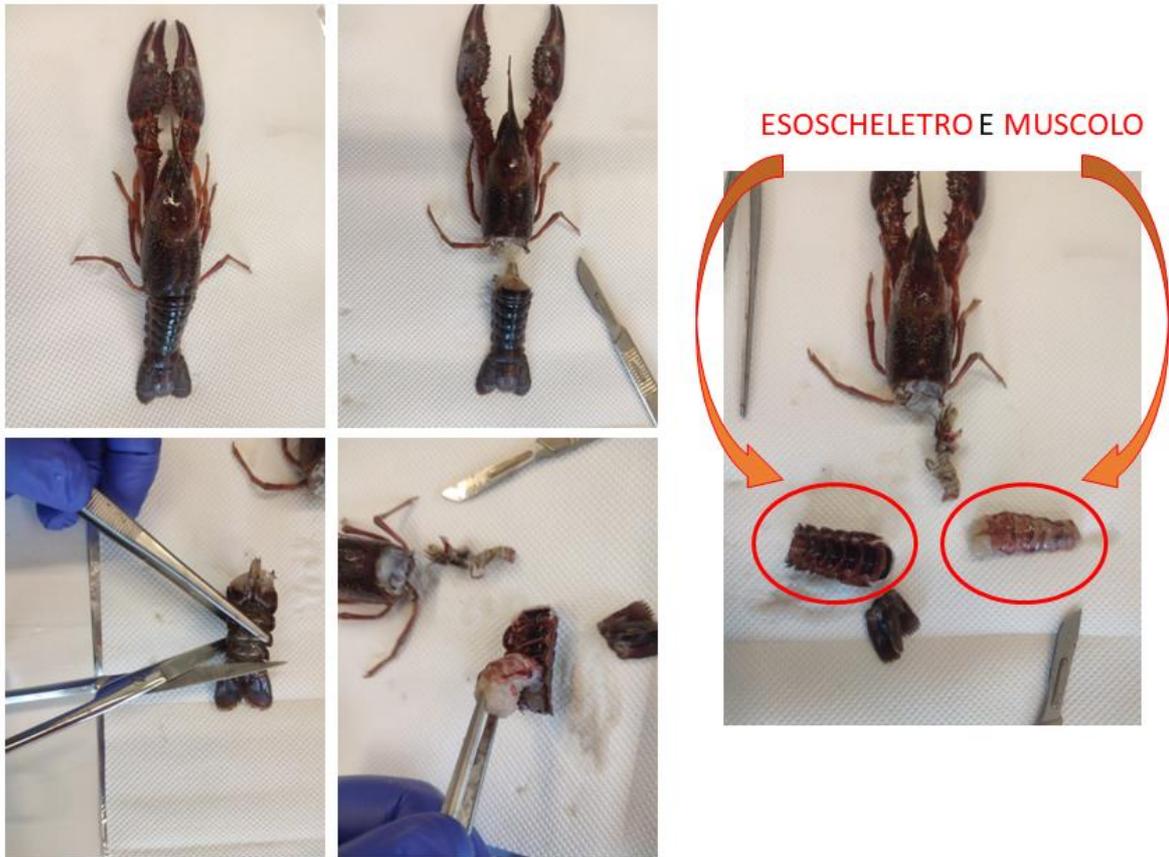
Campionamento e raccolta dei dati biometrici degli individui.

Per ogni sito, i campioni di *P. clarkii* sono stati divisi in cinque sottoinsiemi (pools) (vedi Tab.S2 in Materiale supplementare) al fine di:

- 1) raccogliere elevate quantità di muscolo e/o esoscheletro per le analisi di tutti gli inquinanti;
- 2) aumentare l'omogeneità e la rappresentatività delle misurazioni;
- 3) confrontare per lo stesso pool i diversi inquinanti investigati (ad eccezione delle cianotossine).

I campioni di acqua e sedimento sono stati raccolti e analizzati in triplicato. Nel caso specifico delle cianotossine, per ciascun sito, sono stati preparati 12 pools, di questi 6 costituiti da campioni di muscolo senza intestino e 6 da campioni di muscolo con intestino (Tab. S3).

Sia durante il campionamento che durante la preparazione dei campioni, sono stati utilizzati materiali idonei per evitare contaminazioni da contatto. Come già menzionato, ad esempio, per l'analisi degli ftalati, additivi dei materiali plastici, sono stati utilizzati contenitori di vetro accuratamente avvinati/decontaminati per la conservazione dei campioni.



Dissezione degli individui e prelievo dei campioni di muscolo ed esoscheletro dalla porzione addominale

In particolare, le dissezioni sono state effettuate con l'ausilio di bisturi, forbici e mortai in ceramica accuratamente lavati dopo ogni operazione con cicli di solventi quali acetone e acqua bidistillata per evitare eventuali contaminazioni crociate. Dopo la dissezione, per ognuno dei tre siti, sono stati pesati 15 campioni di muscolo (parte edibile, senza intestino) e 15 campioni di esoscheletro per un totale di 90 campioni. Tutti i campioni sono stati pesati, omogeneizzati, e conservati in tubi di polipropilene sterili e congelati a -20 °C fino alla liofilizzazione. Il liofilizzatore utilizzato per il trattamento dei campioni di gambero (esoscheletro e muscolo) è il modello Alpha 2-4 LD plus freeze-dryer, Martin Christ, Osterode am Harz, D.

La percentuale di acqua presente nei muscoli (80% circa) e nell'esoscheletro (40% circa) è stata determinata secondo tenendo conto del peso umido iniziale del campione (wet weight: w.w.) e del peso secco (dry weight: d.w.) dopo la liofilizzazione, secondo l'equazione (1):

$$(1) \% H_2O \text{ nel campione} = 100 - \frac{d.w.}{w.w.} \times 100$$

I metalli pesanti

Non esiste una definizione universalmente accettata di metallo pesante basata sulle proprietà chimico-fisiche. Sono state proposte delle definizioni in base alla densità ($>5 \text{ g cm}^{-3}$) o in base al numero atomico (elemento il cui numero atomico sia maggiore di 20) (Ali & Khan, 2018a). D'altra parte, le principali caratteristiche chimiche dei metalli pesanti, ossia il carattere cationico con diversi stati di ossidazione e l'elevata attitudine a formare complessi molecolari nel citoplasma cellulare, fa includere nell'elenco dei metalli pesanti anche elementi, come il selenio e l'arsenico, che non sono metalli, sebbene siano dotati di proprietà fisiche e chimiche simili a quelle dei metalli in senso stretto per questo chiamati semimetalli. Per questi motivi è stato talora proposto di abbandonare la classificazione in base alla densità o al peso atomico in favore di una nuova classificazione tripartita degli elementi chimici a seconda che esibiscano una prevalente affinità per gli atomi di ossigeno, per quelli di azoto e zolfo, o infine un comportamento intermedio tra le due precedenti categorie (Hogan, 2010).

Alcuni metalli pesanti detti 'essenziali' (per le funzioni biologiche), si ritrovano all'interno delle cellule e sono necessari per la sopravvivenza delle stesse; invece i metalli pesanti 'non essenziali', non si dovrebbero ritrovare all'interno dell'organismo in quanto potenzialmente tossici (ad es. cancerogeni o interferenti endocrini) a causa della loro capacità di competere con i metalli essenziali nei siti di legame. I metalli pesanti possono formare legami covalenti con gruppi organici creando molecole lipofile capaci di attraversare le membrane cellulari e produrre composti ancora più tossici (ad es. piombo tetraalchilico, metilmercurio, forme metilate di arsenico, ecc.) oppure legarsi ai costituenti non metallici delle molecole cellulari, come i gruppi sulfurei delle proteine, causando effetti tossici (Walker et al., 2006). Ne consegue che l'impatto sull'ambiente di questi inquinanti è legato alla spiccata tendenza dei metalli ad accumularsi nei tessuti animali e vegetali attraverso vie di esposizione come l'acqua, i sedimenti e l'aria (Rand, 1995). In un organismo, la dieta, lo stadio di sviluppo, la fisiologia, le funzioni biochimiche influenzano il grado di tossicità di metalli e semimetalli così come la loro concentrazione e la durata dell'esposizione.

In ambiente acquatico, la qualità dell'acqua influenza la tossicità attraverso le interazioni di pH, durezza e salinità. Inoltre, sebbene la concentrazione di metalli nella colonna d'acqua sia generalmente bassa a causa della loro scarsa solubilità, la loro tendenza a precipitare sul fondo espone tutti gli organismi connessi ad esso a raggiungere livelli di contaminazione tali da causarne effetti tossici (Briffa et al., 2020).

I metalli pesanti hanno una distribuzione ubiquitaria e sono soggetti a fenomeni di bioaccumulo e biomagnificazione lungo la catena alimentare con implicazioni negative sulla fauna selvatica e

sulla salute umana (Ali & Khan 2018b). Nell'uomo, questi possono entrare all'interno dell'organismo per ingestione o attraverso vie respiratorie e cutanee ed essere escreti tramite il sudore, l'urina, le feci, la desquamazione della cute ed infine tramite i capelli. Le fonti di contaminazione possono riguardare sorgenti naturali (ad es. attività vulcaniche) o antropiche (attività minerarie, fonderie, raffinerie, inceneritori di rifiuti o dall'utilizzo di combustibili fossili, produzione di erbicidi, ecc) dalle quali i metalli pesanti si diffondono per dilavamento dai terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici (Ali et al., 2019). Qui, come già accennato, possono subire trasformazioni biologiche e chimiche, che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti) e negli organismi, sia vegetali che animali.

La mineralizzazione acida dei campioni è stata eseguita con un sistema di digestione a microonde (Ethos Up Milestone connect High Performance Microwave Digestion System) dotato di 15 contenitori. Per le procedure di estrazione sono stati utilizzati i seguenti solventi: acido nitrico (HNO_3 67-69,0%, Carlo Erba Ultrapure for trace analysis), perossido di idrogeno (H_2O_2 30,0%, Sigma Aldrich for trace analysis) e acido cloridrico HCl (34-37% Superpure for trace analysis). I campioni sono stati filtrati con siringhe dotate di filtri in acetato di cellulosa (dimensione dei pori: 0,45 μm , diametro: 25 mm, AISIMÔ) e infine analizzati in spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (Agilent 7800 ICP-MS con autocampionatore SPS4).

Le percentuali di recupero degli elementi sono state ottenute utilizzando materiale certificato. Per i gamberi i campioni di controllo di qualità sono stati il NIST-1566b (Oyster Tissue) e il DORM-4 (Fish protein). Per analisi delle acque sono stati utilizzati come standard di controllo il CIAC 12A Unichim, il CIAC 13A Unichim e lo standard di laboratorio a 100 ppb ($\mu\text{g L}^{-1}$). Per quanto riguarda i sedimenti sono stati utilizzati il Meta 18 Unichim, il CIAC 12 A, e lo standard di laboratorio a 100 ppb.

Estrazione in campioni di *P. clarkii*: circa 0.6 g di ogni campione liofilizzato sono stato digeriti completamente utilizzando una miscela contenente 8 mL di HNO_3 e 2 mL di H_2O_2 in contenitori di Teflon secondo il metodo EPA 3052. Per ogni ciclo di mineralizzazione sono stati preparati campioni, bianchi e materiali certificati di riferimento (CRM). La digestione acida è stata effettuata utilizzando un sistema di riscaldamento controllato da computer: da 20 °C a 180 °C in 15 minuti, mantenimento a 180 °C per 55 minuti e raffreddamento in 10 minuti. Quindi i campioni sono stati portati ad un volume di 20 mL con acqua bidistillata e filtrati ed analizzati attraverso ICP-MS.

Estrazione in campioni di acqua e sedimenti: in laboratorio, i campioni di acqua (100 mL ciascuno) sono stati filtrati e stabilizzati con 1 mL di HNO_3 . Il protocollo utilizzato è quello previsto per le acque superficiali EPA 200.8. I campioni di acqua così trattati sono stati analizzati all'ICP-

MS. I sedimenti, dopo l'arrivo in laboratorio, hanno subito un pretrattamento di asciugatura nel quale sono stati stesi su carta da filtro per eliminare l'acqua presente. Dopo 48h, è stata eseguita l'analisi in doppio dell'umidità residua come previsto dal DM13/09/1999 met II 2. Successivamente, circa 0.6 g di ogni campione di sedimento, addizionato con 6 mL HNO₃ e 3 mL di HCl, è stato sottoposto alla digestione acida con il microonde secondo i metodi EPA 3052 ed EPA 3051 a. Quindi i campioni sono stati portati ad un volume di 20 mL con acqua bidistillata e filtrati ed analizzati attraverso ICP-MS. La procedura analitica utilizzata era conforme al metodo EPA 200.8 integrato da EPA 6020b ed EPA 3052 sono state eseguite tre repliche per ciascuna misurazione. Ad ogni campione analitico, compresi i campioni di taratura, è stato aggiunto un volume costante di standard interno misto costituito da Bi, Ho, In, Gf, Sc, Tb, Y e Rh in HNO₃ ad una concentrazione di 200 ppb durante l'analisi, attraverso la pompa peristaltica dell'ICP-MS. Per verificare l'eventuale contaminazione del sistema di misura, sono state incluse nella worklist diverse soluzioni di lavaggio (rinse blank solution) (1-5% HNO₃ e 0.3-1% HCl) e, nel caso specifico del mercurio, per evitare l'effetto memoria dovuto alla sua presenza nei campioni, sono state intervallate soluzioni in oro (Au) (200 ppb di Au in HNO₃ al 7%). La taratura multielemento per la determinazione degli elementi, inclusi i metalli pesanti, è stata effettuata partendo dalle soluzioni standard dei singoli analiti (concentrazione iniziale 1000 mg L⁻¹ (ppm)). Gli analiti ricercati erano: selenio (Se), cobalto (Co), stagno (Sn), vanadio (V), ferro (Fe), rame (Cu), manganese (Mn), zinco (Zn), cromo (Cr), mercurio (Hg), cadmio (Cd), boro (B), bario (Ba), piombo (Pb), antimonio (Sb), nichel (Ni), argento (Ag) e arsenico (As).

L'intervallo di calibrazione utilizzato era di 0-160 ppb per tutti gli elementi ad eccezione del mercurio, per il quale sono state selezionate concentrazioni più diluite nell'intervallo da 0 a 4 ppb.

I coefficienti di correlazione hanno mostrato valori elevati ($R^2 = 0.9999$ per ogni elemento).

Un'analisi parallela dei bianchi procedurali e materiale di riferimento certificato (CRM) ha garantito controlli di qualità e accuratezza. Tali analisi hanno mostrato meno del 10% di deviazione standard relativa. Le percentuali di recupero (R) per ciascun elemento nelle matrici biologiche sono state ottenute attraverso l'analisi del CRM (Tabella S1 nei materiali supplementari) secondo l'equazione (2):

$$(2) R = \frac{100 \times D_{MC} \times \left(\frac{V_{MC}}{W_{MC}} \right)}{C_{MC}}$$

D_{MC} = concentrazione rilevata del campione relativo al materiale certificato ($\mu\text{g L}^{-1}$)

V_{MC} = volume finale utilizzato per la mineralizzazione del campione - materiale certificato (L)

W_{MC} = peso del campione del materiale certificato (g)

C_{MC} = concentrazione nominale dell'analita presente nel materiale certificato ($\mu\text{g g}^{-1}$)

In questo modo, per ogni elemento sono stati calcolati i fattori di correzione ($CF = 100/R$) utilizzati per la corretta quantificazione della concentrazione di ogni analita presente nei diversi campioni. Il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati come la concentrazione media, relativa a 10 misurazioni ripetute del bianco, dei segnali di massa analitica selezionati +3 (per il LOD) e +10 (per il LOQ) della deviazione standard (DS). I risultati di LOD, LOQ e recuperi per ciascuna matrice sono riportati in Tabella S4 nei materiali supplementari.

L'analisi delle coordinate principali (PCoA) è stata eseguita per visualizzare somiglianze o differenze di dati (tra siti e tipo di campione/matrice analizzata) e per riassumere i dati di concentrazione elementare multivariata. Le concentrazioni degli elementi sono state normalizzate, prima di eseguire la PCoA, per rimuovere l'effetto delle elevate differenze tra gli ordini di grandezza relativi alle concentrazioni dei vari elementi. Sono state elaborate due PCoA, in un caso sono state prese in considerazione solo le due matrici biologiche (esoscheletro e muscolo), nell'altro caso sono state incluse anche le matrici ambientali (sedimenti e acqua).

È stata eseguita un'analisi multivariata permutazionale bidirezionale della varianza (two-way PERMANOVA) per valutare l'importanza delle differenze nel profilo di contaminazione tra i siti e tra le matrici. Ogni termine nell'analisi è stato testato da 9999 permutazioni casuali. Il disegno sperimentale comprendeva tre fattori [siti (LR, GB, RC, tre livelli, fisso e ortogonale) e matrice (muscolo, esoscheletro, sedimenti, acqua, quattro livelli, fissi e ortogonale)] e 18 variabili corrispondenti agli elementi analizzati.

Le analisi PCoA e PERMANOVA sono state calcolate sulla base della distanza euclidea.

Per l'analisi statistica, i valori al di sotto il limite di quantificazione sono stati sostituiti con il corrispondente $LOD/2$.

Nei “*box e jitter plot*”, utilizzati per la rappresentazione dei dati di contaminazione, i 25-75 percentili sono rappresentati dal box; minimo e massimo sono mostrati alla fine delle linee verticali all'interno dei box mentre la mediana è marcata come una linea orizzontale all'interno del box. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando i software PAST 3 e PAST 4.04 (Hammer et al., 2001).

I livelli di concentrazione medi degli elementi dei diversi campioni analizzati sono riportati in Tabella 2; le singole analisi per pool (biologico) o per campione (ambientale) e sono riportate in Tabella S5 nei materiali supplementari. Tutti i valori di concentrazione sono riportati in peso secco (d.w.) e il simbolo < si riferisce ai valori inferiori al limite di quantificazione.

Sito	Matrice	Sb	As	B	Cd	Co	Cr	Fe	Mn	Hg	Ni	Pb	Cu	Se	V	Zn	Ag	Sn	Ba
LR	Muscolo (n=5)	<	0.92 ± 0.57	1.23 ± 0.22	<	<	0.43 ± 0.20	94.02 ± 69.09	11.52 ± 7.09	0.223 ± 0.102	2.11 ± 3.22	<	52.41 ± 21.53	1.19 ± 0.44	0.08* ± 0.08	88.96 ± 8.25	<	<	0.74 ± 0.40
	Esoscheletro (n=5)	<	0.41 ± 0.14	4.46 ± 0.61	<	1.60 ± 0.56	1.13 ± 0.21	671.10 ± 291.76	528.63 ± 183.04	0.015 ± 0.005	1.19 ± 0.35	0.11 ± 0.14	29.53 ± 4.30	0.41 ± 0.03	1.12 ± 0.36	15.90 ± 4.64	<	<	146.34 ± 24.99
	Sedimenti (n=3)	<	6.51 ± 0.90	11.53 ± 7.48	0.119 ± 0.025	7.30 ± 2.56	32.33 ± 22.08	21158.99 ± 5254.55	385.67 ± 58.96	0.014 ± 0.004	15.61 ± 4.87	6.59 ± 3.37	8.34 ± 3.07	1.20 ± 0.54	40.02 ± 23.71	44.38 ± 17.14	<	0.72 ± 0.67	143.91 ± 66.06
	Acqua (n=3)	<	<	304.82 ± 19.64	0.005* ± 0.006	1.39 ± 0.11	<	14.94* ± 22.24	0.49* ± 0.60	<	1.30* ± 2.00	<	<	<	<	<	<	NA	<
GB	Muscolo (n=5)	<	2.43 ± 0.37	1.59 ± 0.27	<	<	0.15 ± 0.13	29.08 ± 8.03	1.11 ± 0.55	0.297 ± 0.088	0.19 ± 0.20	<	27.07 ± 5.53	0.51 ± 0.04	<	106.25 ± 22.77	<	<	5.85 ± 2.94
	Esoscheletro (n=5)	<	0.86 ± 0.11	6.11 ± 1.07	<	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.15	189.29 ± 28.73	68.63 ± 12.90	0.009 ± 0.002	0.30 ± 0.14	<	12.24 ± 1.40	0.27 ± 0.13	0.41 ± 0.08	14.95 ± 3.23	<	<	142.09 ± 13.89
	Sedimenti (n=3)	0.55 ± 0.05	16.47 ± 0.81	16.81 ± 2.75	0.132 ± 0.013	4.54 ± 0.62	17.50 ± 1.06	10593.61 ± 515.39	192.69 ± 22.62	0.036 ± 0.003	7.25 ± 0.36	12.63 ± 2.51	25.46 ± 1.41	0.83 ± 0.05	33.47 ± 1.59	40.51 ± 5.85	<	0.58 ± 0.07	47.31 ± 6.54
	Acqua (n=3)	0.37 ± 0.26	10.97 ± 0.44	634.25 ± 11.75	0.004 ± 0.005	<	<	19.68 ± 3.87	1.37 ± 2.11	<	<	<	<	<	0.94 ± 0.68	<	NA	<	32.41 ± 0.50
RC	Muscolo (n=5)	<	1.90 ± 0.14	1.42 ± 0.19	0.005 ± 0.006	<	0.54 ± 0.28	91.40 ± 64.72	16.40 ± 9.99	0.363 ± 0.082	0.73 ± 0.26	<	53.57 ± 12.14	1.09 ± 0.07	<	117.14 ± 8.96	<	<	5.85 ± 2.94
	Esoscheletro (n=5)	<	0.50 ± 0.09	5.02 ± 0.22	<	0.82 ± 0.16	0.74 ± 0.17	351.47 ± 122.65	171.96 ± 57.49	0.009 ± 0.001	0.85 ± 0.08	<	19.55 ± 5.60	0.38 ± 0.04	0.95 ± 0.35	12.54 ± 2.77	<	<	537.45 ± 120.68
	Sedimenti (n=3)	<	9.69 ± 2.20	55.56 ± 6.63	0.276 ± 0.037	19.34 ± 2.35	86.51 ± 11.02	40552.88 ± 4096.80	948.91 ± 145.89	0.030 ± 0.004	44.92 ± 2.38	23.94 ± 4.31	30.03 ± 1.47	2.34 ± 0.30	126.10 ± 15.73	123.32 ± 5.67	<	2.40 ± 0.35	265.01 ± 28.49
	Acqua (n=3)	<	4.04 ± 0.47	419.79 ± 57.07	0.011 ± 0.009	<	<	<	0.43* ± 0.49	<	<	<	<	<	6.38 ± 4.14	<	NA	<	49.78 ± 54.28

Livelli di concentrazione medi ($\mu\text{g g}^{-1}$ d.w. o $\mu\text{g L}^{-1}$ per acque) \pm DS misurati per ciascuna delle diverse matrici nei tre siti (LR: Lago Rosamarina; GB: Gorgo Basso; RC: Risaie di Cuccumella). n = numero dei pool analizzati nel caso dei campioni biologici (muscolo ed esoscheletro) e numero dei singoli campioni per le matrici ambientali (sedimenti e acqua).

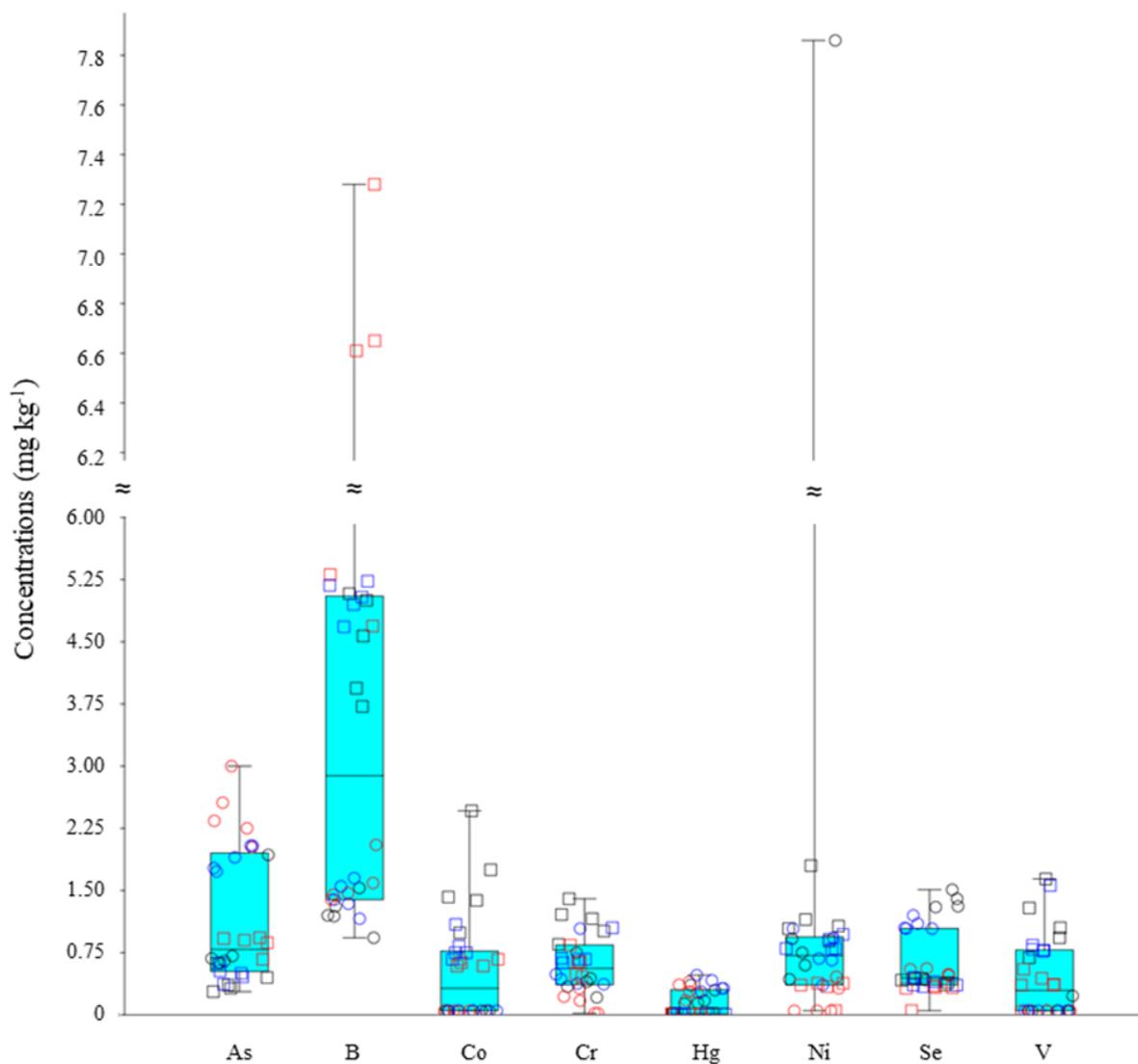
Antimonio, argento, stagno, cadmio (ad eccezione di un campione di muscolo contaminato) e piombo (ad eccezione di un campione di esoscheletro contaminato) sono tutti sotto il limite di quantificazione nei campioni biologici.

Arsenico, mercurio, nichel, rame, selenio e zinco hanno mostrato valori medi più alti nei campioni di muscolo (As: 1.75 mg kg⁻¹; Hg: 0.29 mg kg⁻¹; Ni: 1.01 mg kg⁻¹; Cu: 44.35 mg kg⁻¹; Se: 0.93 mg kg⁻¹; Zn: 104.12 mg kg⁻¹) rispetto a quelli di esoscheletro (As: 0.59 mg kg⁻¹; Hg: 0.29 mg kg⁻¹; Ni: 0.78 mg kg⁻¹; Cu: 20.44 mg kg⁻¹; Se: 0.36 mg kg⁻¹; Zn: 14.46 mg kg⁻¹).

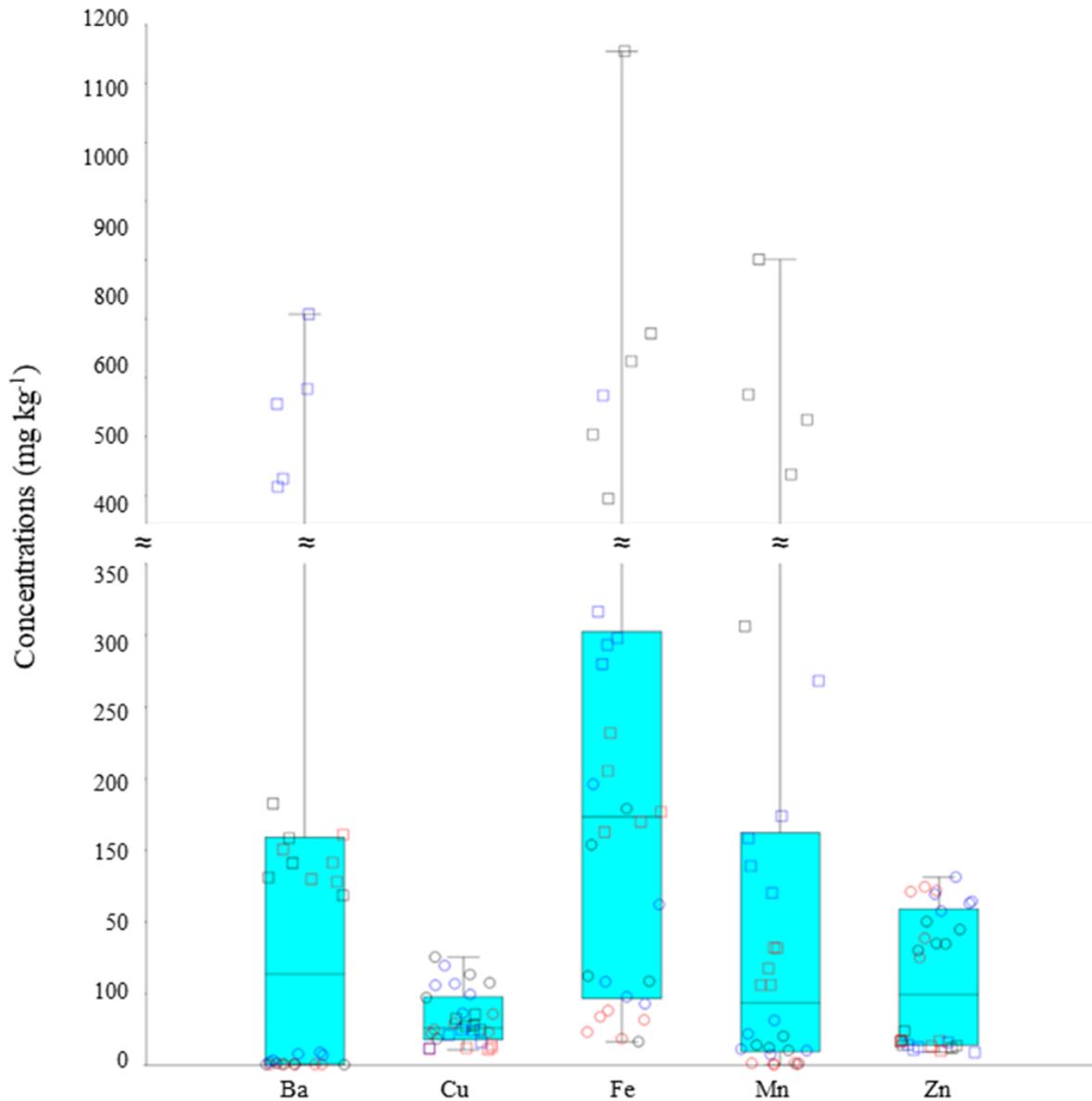
Boro, ferro, manganese, vanadio, bario e cobalto invece hanno mostrato valori medi più elevati nell'esoscheletro (B: 1.41 mg kg⁻¹; Fe: 403.95 mg kg⁻¹; Mn: 9.68 mg kg⁻¹; V: 0.83 mg kg⁻¹; Ba: 2.40

mg kg⁻¹; Co: 1.02 mg kg⁻¹) rispetto al muscolo (B: 5.2 mg kg⁻¹; Fe: 71.50 mg kg⁻¹; Mn: 256.41 mg kg⁻¹; V: 0.06 mg kg⁻¹; Ba: 275.29 mg kg⁻¹; Co: <LOQ).

Nelle Figure seguenti possibile osservare le differenze tra le composizioni elementari di muscolo ed esoscheletro.

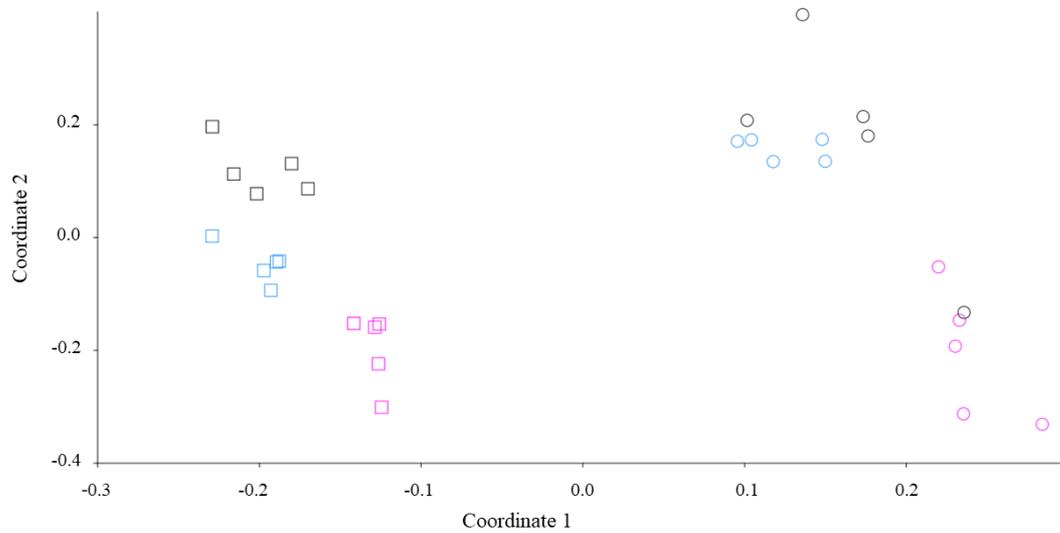


Box e jitter. Concentrazioni degli elementi in muscolo (cerchi) ed esoscheletro (quadrati) relativi ai siti LR (nero), GB (rosso), RC (blu).



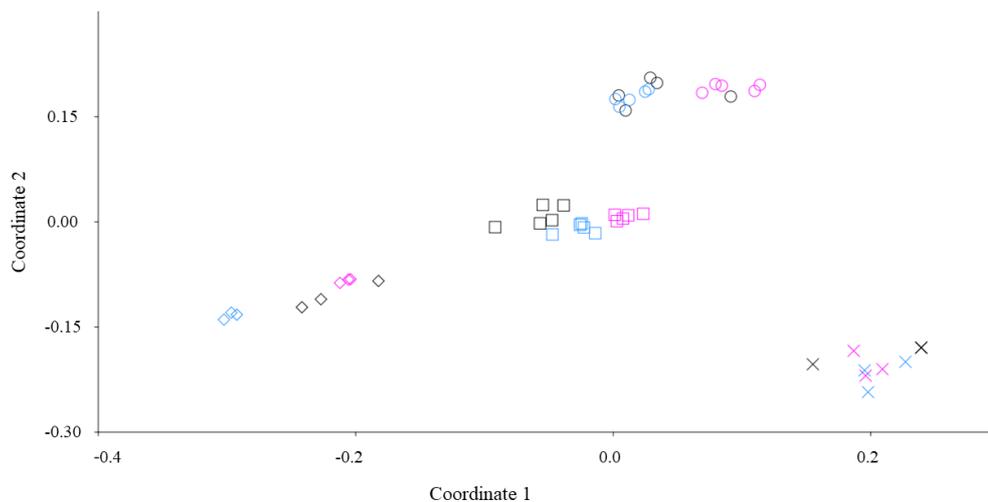
Box e jitter. Concentrazioni degli elementi in muscolo (cerchi) ed esoscheletro (quadrati) relativi ai siti LR (nero), GB (rosso), RC (blu).

L'analisi PCoA ha mostrato una chiara separazione in termini di contaminazione tra i campioni di muscolo (Figura seguente, cerchi a destra) e quelli di esoscheletro (Figura seguente, quadrati a sinistra). Analogamente, osservando singolarmente le due matrici, si è osservato una differenza relativa ai siti (colori). In particolare, tale differenza, osservabile dalla maggiore clusterizzazione tra gli stessi simboli dello stesso colore, risulta maggiormente evidente nei campioni di esoscheletro.



Analisi delle coordinate principali (PCoA) relativa a campioni di muscolo (cerchi) ed esoscheletro (quadrati) relativi ai campioni provenienti dal Lago Rosamarina (nero), Gorgo Basso (fucsia) e Risaie di Cuccumella (celeste). Coordinata 1: variazione totale = 82%; Coordinata 2: variazione totale = 10%.

Espandendo tale analisi anche ai campioni ambientali, è possibile osservare nette separazioni tra il profilo di contaminazione delle quattro matrici analizzate e in alcuni casi differenze nei raggruppamenti all'interno della stessa matrice tra i diversi siti.

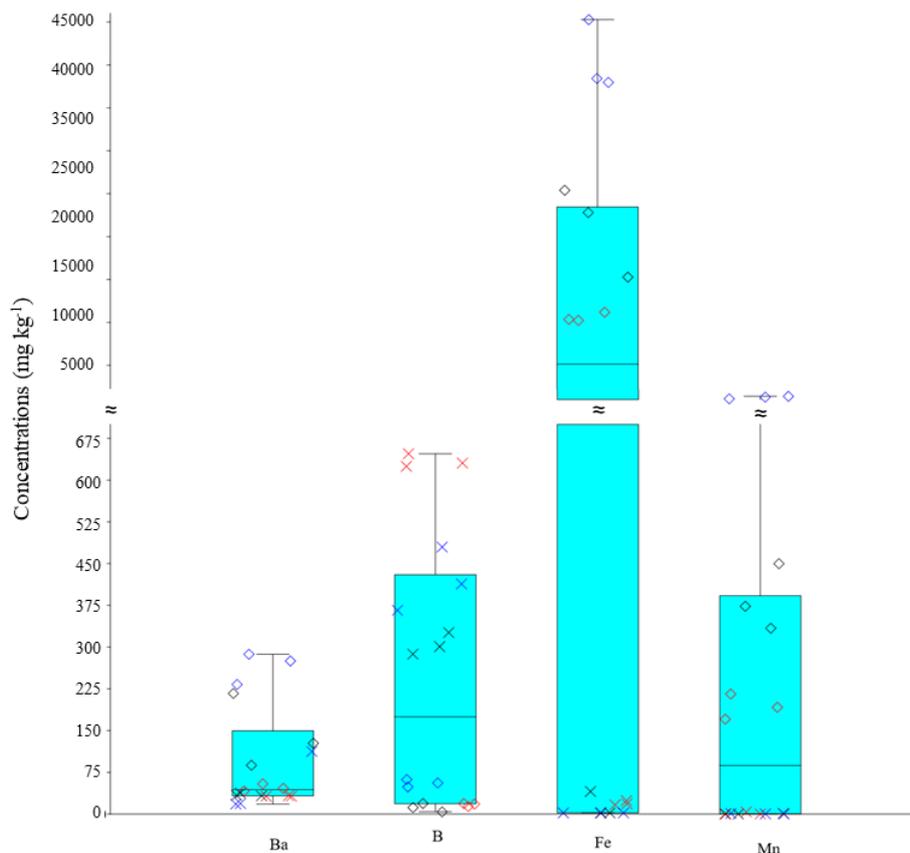


Analisi delle coordinate principali (PCoA) relativa a tutti i campioni analizzati: muscolo (cerchi), esoscheletro (quadrati), sedimenti (rombi) e acqua (X) relativi ai campioni provenienti dal Lago Rosamarina (nero), Gorgo Basso (fucsia) e risaie di Cuccumella (celeste). Coordinata 1: variazione totale = 51%; Coordinata 2: variazione totale = 34%.

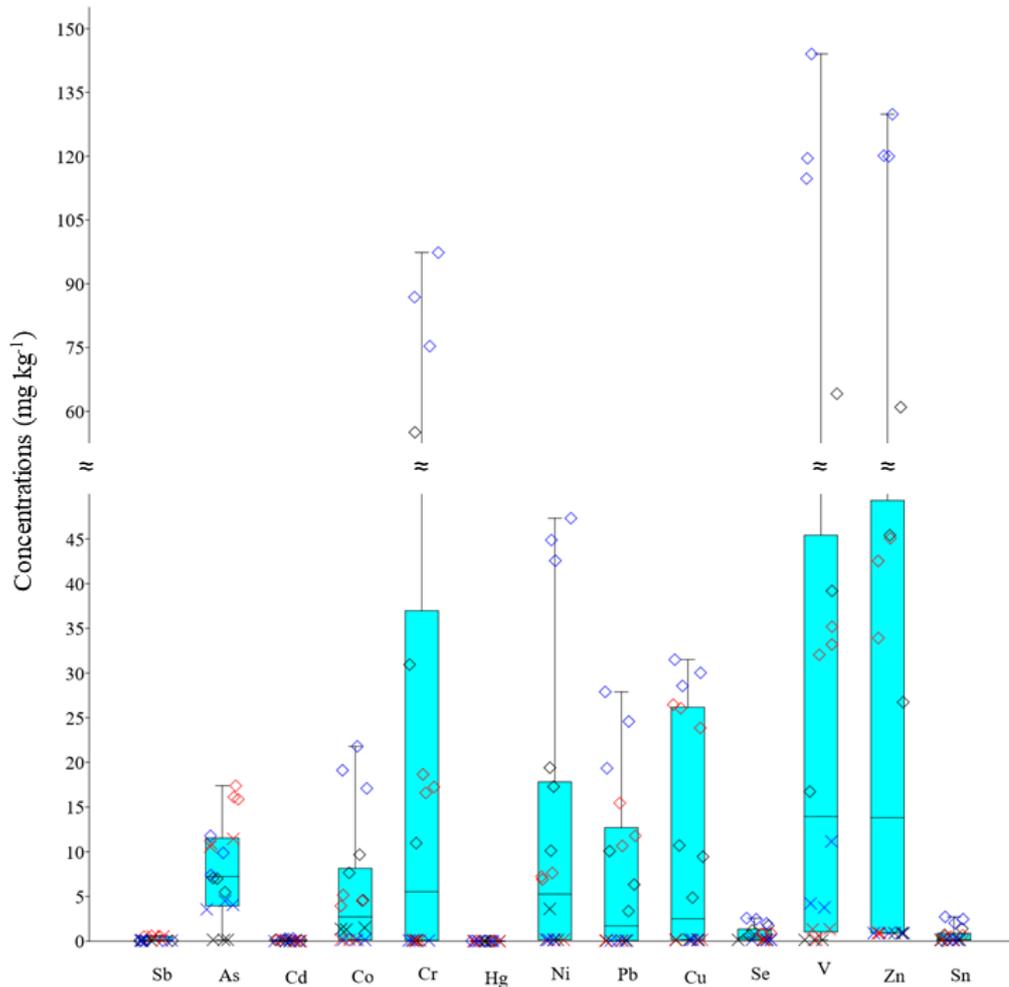
L'analisi PERMANOVA ha mostrato differenze significative tra i profili di contaminazione osservati sia tra i siti (PERMANOVA; $p = 0.001$) sia tra le matrici (PERMANOVA; $p = 0.001$) che considerando entrambi i fattori (interazione tra siti e matrici) (PERMANOVA; $p = 0.001$).

Sulla base delle differenze osservate tra i siti nel profilo di contaminazione elementare in muscolo ed esoscheletro, le PCoA che l'analisi PERMANOVA suggeriscono che *P. clarkii* potrebbe rappresentare un ottimo bioindicatore dello stato di contaminazione ambientale.

Riguardo alle analisi chimiche condotte sulle matrici ambientali, è possibile osservare che, ad eccezione del boro, per tutti gli elementi i livelli di concentrazione sono maggiori nei campioni di sedimento rispetto a quelli di acqua. Inoltre, ad eccezione di pochi casi, i campioni prelevati da ciascun sito nelle tre diverse zone hanno mostrato concentrazioni simili.



Box e jitter. Concentrazioni degli elementi in muscolo (cerchi) ed esoscheletro (quadrati) relativi ai siti LR (nero), GB (rosso), RC (blu).



Box e jitter. Concentrazioni degli elementi in muscolo (cerchi) ed esoscheletro (quadrati) relativi ai siti LR (nero), GB (rosso), RC (blu).

Ad eccezione dell'arsenico e del mercurio, i sedimenti provenienti dalle Risaie di Cuccumella risultano maggiormente contaminati rispetto al Lago Rosamarina e al Gorgo Basso. Invece, ad eccezione di cobalto, nichel, vanadio e bario, i campioni di acqua provenienti da Gorgo Basso presentavano le concentrazioni maggiori degli elementi analizzati rispetto agli altri siti.

Comparando i risultati ottenuti nel presente lavoro con quanto rilevato negli esemplari di *P. clarkii* analizzati da Goretti et al., 2016 nel lago Trasimeno e in un'area industriale del centro Italia, appare evidente che le concentrazioni degli analiti in comune (Cd, Pb, Zn e Cu) analizzati nel nostro lavoro risultano essere più basse. Le concentrazioni medie di cadmio rilevate nel muscolo addominale erano di 2.4 mg kg^{-1} nel sito industriale e di 2.2 mg kg^{-1} nel muscolo degli individui catturati nel lago Trasimeno. Nei tre siti monitorati in Sicilia soltanto nelle Risaie di Cuccumella il muscolo di *P. clarkii* ha mostrato una concentrazione media di cadmio di 0.005 mg kg^{-1} mentre negli

altri due siti era sotto il limite di quantificazione. Il cadmio non è stato rilevato neanche in Campania (Ariano et al., 2021), mentre in altri paesi, in particolare in Egitto (Shaaban et al., 2017) e in Cina (Mo et al., 2022), i livelli di cadmio erano almeno di un ordine di grandezza superiore rispetto a quanto osservato da noi nelle Risaie di Cuccumella.

Nei tre siti siciliani il piombo nel muscolo era sotto il limite di quantificazione a differenza di quanto osservato nel muscolo degli esemplari di *P. clarkii* catturati nel sito industriale del centro Italia (media = 0.9 mg kg⁻¹) e in quelli del lago Trasimeno (media = 2.0 mg kg⁻¹).

Il piombo era sotto il limite di rilevazione anche negli individui catturati in Campania (Ariano et al., 2021), a differenza dei seppur bassi livelli registrati in Spagna (Suarez-Serrano et al., 2010) e degli alti livelli osservati in alcuni esemplari catturati sulle rive del Nilo (Egitto), in media fino a circa 10 mg kg⁻¹ (Shaaban et al., 2017).

Zinco e rame hanno mostrato rispettivamente concentrazioni medie di 156 e 187 mg kg⁻¹ nei muscoli di individui catturati nel sito industriale e di 98 e 27 mg kg⁻¹ in quelli del lago Trasimeno (Goretti et al., 2016).

Nella presente ricerca le medie ottenute per lo zinco nei tre siti siciliani (LR: 88.96 mg kg⁻¹; GB: 106.25 mg kg⁻¹; RC: 117.14 mg kg⁻¹) erano simili a quanto osservato nel centro Italia.

Allo stesso modo, per il rame, i valori ottenuti in Sicilia (LR: 52.41 mg kg⁻¹; GB: 27.07 mg kg⁻¹; RC: 53.57 mg kg⁻¹) erano dello stesso ordine di grandezza di quanto registrato nel lago Trasimeno e più bassi di quelli del sito industriale. I livelli di zinco e rame erano simili a quanto osservato anche in Spagna (Sanchez et al., 2004; Alcorlo et al. 2006; Suarez-Serrano et al., 2010) e in Louisiana (USA) (Hogan et al., 2007).

In generale, questi ultimi due elementi (Cu e Zn) sono essenziali per gli organismi e non destano particolare preoccupazione a queste concentrazioni in quanto i loro livelli possono essere regolati attraverso i processi fisiologici.

Sempre nel muscolo, per quanto riguarda As (media dei 3 siti = 1.75 mg kg⁻¹), Hg (media dei 3 siti = 0.29 mg kg⁻¹) e Cr (media dei 3 siti = 0.37 mg kg⁻¹), i valori da noi osservati sono leggermente superiori a quanto rilevato in Campania (As media di 2 siti = 0.54 mg kg⁻¹; Cr: media di 2 siti = 0.05 mg kg⁻¹; Hg: media di 2 siti = <LOQ) (Ariano et al., 2021).

Confrontando questi tre elementi con altri studi presenti in letteratura, per l'arsenico le concentrazioni da noi rilevate risultano dello stesso ordine di grandezza osservato da Suarez-Serrano et al. (2010) e da Mo et al. (2022).

Per il mercurio, i valori da noi osservati risultano più bassi di quanto registrato in Spagna da Suarez-Serrano et al. (2010) (Hg, range 0.22-3.1 mg kg⁻¹) e da Higuera et al. (2006) (Hg, range: 2.4-

9.1 mg kg⁻¹), in Louisiana (USA) da Hogan et al. (2007) (Hg, range: 60-70 mg kg⁻¹) e da Mo et al. (2022) in diversi laghi della Cina (Hg, range: 0.02 - 0.06 mg kg⁻¹ w.w.).

Analogamente i valori trovati nel nostro studio per il cromo risultano inferiori a quanto registrato nei campioni di muscolo di *P. clarkii* in Spagna (media di 7 siti = 1.94 mg kg⁻¹) (Suarez-Serrano et al., 2010) e in Cina (media di 7 siti = 0.22 mg kg⁻¹ w.w.) (Mo et al., 2022).

In un altro studio più recente di quello di Goretti et al. (2016), condotto sul Lago Trasimeno in altri siti di campionamento, sono stati analizzati nel muscolo di *P. clarkii* i seguenti elementi: Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Pb, Hg (Selvaggi et al., 2023). In quest'ultimo sono state considerate le variabili di stagionalità e sesso degli animali. Le maggiori concentrazioni sono state rilevate in estate mentre, relativamente alle variazioni nel bioaccumulo degli elementi in relazione al sesso degli individui non sono state osservate differenze significative (Selvaggi et al., 2023).

Per il confronto tra i livelli ottenuti da noi con quanto rilevato da Selvaggi et al. (2023) sono stati trasformati i loro valori in concentrazione su peso secco seguendo l'equazione (3):

$$(3) d. w. = \frac{w.w.}{\left(1 - \frac{\% H_2O}{100}\right)}$$

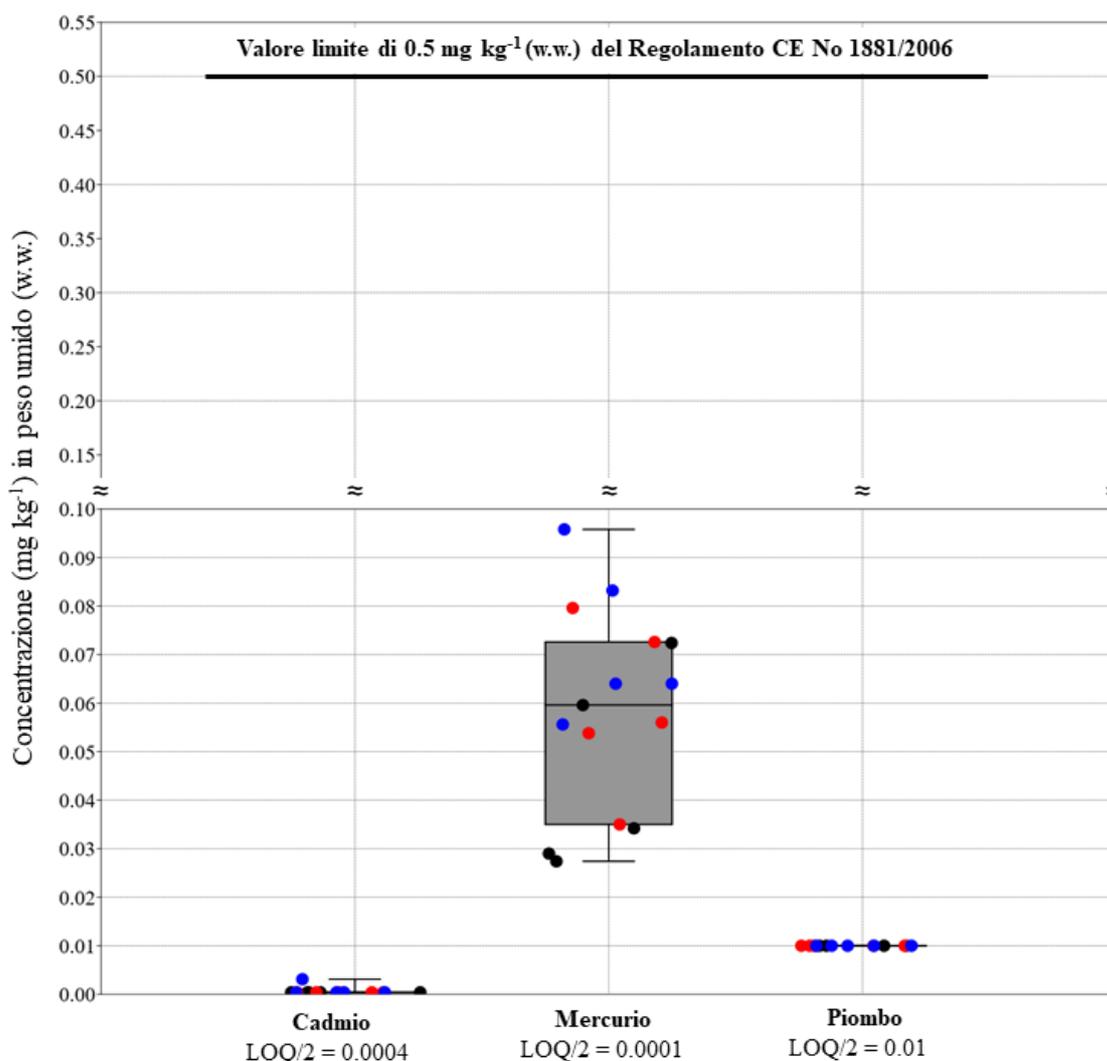
La comparazione è stata condotta considerando l'analisi effettuata nella stagione estiva da Selvaggi et al., (2023) ed è emerso che, per diversi elementi nel nostro lavoro la concentrazione era inferiore: Cr (media dei siti siciliani: 0.37 mg kg⁻¹ vs 32.5 mg kg⁻¹), Fe (media dei siti siciliani: 71.5 mg kg⁻¹ vs 182 mg kg⁻¹), Co (media dei siti siciliani: <LOQ vs 0.2 mg kg⁻¹), Ni (media dei siti siciliani: 1.01 mg kg⁻¹ vs 44 mg kg⁻¹); mentre per i restanti era simile: Ag (media dei siti siciliani: <LOQ vs 0.04 mg kg⁻¹), Cd (media dei siti siciliani: <LOQ vs 0.02 mg kg⁻¹), Pb (media dei siti siciliani: <LOQ vs 0.14 mg kg⁻¹); Hg (media dei siti siciliani: 0.29 mg kg⁻¹ vs 0.22 mg kg⁻¹) o leggermente superiore nel caso di tre elementi essenziali: Mn (media dei siti siciliani: 9.68 mg kg⁻¹ vs 6 mg kg⁻¹), Cu (media dei siti siciliani: 44.35 mg kg⁻¹ vs 33.5 mg kg⁻¹), Zn (media dei siti siciliani: 104.12 mg kg⁻¹ vs 69 mg kg⁻¹).

In generale, per quanto riguarda gli elementi in traccia non essenziali, la legislazione dell'Unione europea (Regolamento CE No 1881/2006) sulla sicurezza alimentare stabilisce chiaramente i valori limite per i muscoli dei crostacei per il consumo umano. In particolare, i tenori massimi, relativi al peso umido (w.w.) sono di 0.5 mg kg⁻¹ per cadmio, piombo e mercurio.

I valori relativi a tutti i campioni di muscolo di *P. clarkii* risultano inferiori già considerando il peso secco. Effettuando comunque la conversione da dry weight a wet weight secondo l'equazione (4):

$$(4) w.w. = d.w. \times \left(1 - \frac{\% H_2O}{100}\right)$$

si ottiene che per Cd il valore massimo di 0.016 mg kg⁻¹ d.w. corrisponde a 0.0031 mg kg⁻¹ w.w., per Hg il valore massimo di 0.479 mg kg⁻¹ d.w. corrisponde a 0.0958 mg kg⁻¹ w.w.; infine Pb era sotto il limite di rilevazione in tutti i campioni di muscolo analizzati.



Concentrazioni di Cd, Hg, Pb nel muscolo di *P. clarkii* convertite in peso umido rispetto ai tenori massimi riportati nel Regolamento CE No 1881/2006. Siti LR (nero), GB (rosso), RC (blu).

Quindi nel presente lavoro nessuno dei campioni supera i limiti di soglia dalla normativa europea. Per questi elementi, i livelli di concentrazione del muscolo risultano accettabili per fini alimentari. Inoltre, confrontando i risultati delle matrici biologiche con quelle ambientali, è possibile notare che, ad eccezione dei bassi livelli di concentrazione del mercurio nel muscolo che risultano superiori ai livelli registrati nei sedimenti e nell'acqua, nessuno degli elementi nel muscolo o nell'esoscheletro ha una concentrazione media maggiore rispetto ad entrambe le matrici ambientali.

Questi risultati suggeriscono che l'entità di inquinamento in questi siti è tale da non determinare un bioaccumulo significativo nel muscolo e nell'esoscheletro di *P. clarkii*.

Gli antibiotici

Il termine antibiotico, utilizzato per la prima volta dal premio Nobel Selman Waksman si riferisce a molecole prodotte da microrganismi antagoniste della crescita di altri (Clardy et al., 2009). È ormai ben accettato che il termine antibiotico denoti qualsiasi sostanza chimica organica che inibisca o uccida i batteri mediante interazioni specifiche con i bersagli coinvolti. Gli antibiotici appartengono a una classe di farmaci ampiamente utilizzati per trattare e prevenire malattie umane e animali, nonché per aumentare l'efficienza dei mangimi e migliorare il tasso di crescita nelle industrie di acquacoltura, bestiame e pollame (Sarmah et al., 2006). Essi sono in grado di agire efficacemente anche a concentrazioni basse e, nei casi di somministrazioni intra corporali, ad essere espulsi dal corpo dopo brevi tempi di residenza. Molti antibiotici dopo l'assunzione si distribuiscono nell'organismo e vengono parzialmente metabolizzati nel corpo prima di essere espulsi tramite urine e feci. Tuttavia, parte dell'antibiotico viene espulso come metabolita inattivo o alcuni dei metaboliti prodotti possono essere riconvertiti nei loro composti di origine (Jjemba, 2006). In questo modo antibiotici e metaboliti finiscono nelle acque reflue e nei depuratori che non riescono a trattenere o degradare i tali principi attivi giungendo quindi nell'ambiente acquatico per poi degradarsi più o meno velocemente (generalmente da uno a vent'anni) (Grenni et al., 2018). Dalla loro prima introduzione nelle applicazioni cliniche, gli antibiotici hanno salvato innumerevoli vite e tenuto sotto controllo la maggior parte delle malattie infettive. Tuttavia, la produzione e l'uso su larga scala (soprattutto l'abuso) di antibiotici nella medicina clinica e veterinaria, nell'agricoltura, nell'acquacoltura e nell'orticoltura ha generato un loro accumulo significativo nell'ambiente (Senta et al., 2013). Ricerche recenti hanno dimostrato che le concentrazioni di antibiotici nei diversi tipi di acque (reflue, superficiali (reflue, superficiali, potabili, sotterranee) e solidi (fanghi, suolo e sedimenti) sono comprese tra comprese tra $\mu\text{g kg}^{-1}$ e mg kg^{-1} (Chaturvedi et al., 2021).

Come accennato, una delle fonti che maggiormente contribuisce all'inquinamento ambientale è relativa alle frazioni di questi composti che vengono escrete dagli animali da allevamento. Queste molecole, che risiedono nel letame, oltre che giungere negli effluenti, possono essere diffuse su terreni agricoli come fertilizzante. Da lì possono entrare nell'ambiente acquatico attraverso deflusso o lisciviazione (Sarmah et al., 2006).

Gli antibiotici vengono classificati come microinquinanti organici emergenti pseudo-persistenti, perché possono resistere alla biodegradazione a causa della loro natura antimicrobica e possono essere dispersi costantemente impedendo una completa degradazione.

Non sono necessariamente di nuova introduzione ma la loro pericolosità desta attualmente grandi preoccupazioni. Infatti, queste molecole polari o moderatamente polari tendono ad essere tossiche e bioaccumulabili (Liu et al., 2017). In tutto il mondo, i prodotti farmaceutici (insieme ai loro metaboliti e prodotti di trasformazione) si trovano frequentemente nell'ambiente acquatico e sono biodisponibili per tutti gli organismi in esso presenti. Inoltre, vengono sempre più riscontrati residui farmaceutici nell'acqua potabile e nei prodotti alimentari (Wöhler et al., 2020). Dal momento che, sia l'uso farmaceutico umano che quello veterinario continuano ad aumentare globalmente (a causa della crescita della popolazione, del consumo pro capite e della crescita del bestiame), è probabile che con il passare del tempo i problemi si aggravino (Wöhler et al., 2020). Infatti, a differenza degli altri inquinanti organici convenzionali (PCBs, PFAS, PAEs, ecc.), gli antibiotici non solo incidono negativamente sulla qualità dell'ambiente (dimostrata dagli effetti eco tossicologici osservati in diverse specie), ma provocano anche la comparsa e la rapida diffusione nell'ambiente di batteri resistenti agli (Wöhler et al., 2020). La rilevazione dei macrolidi, delle tetracicline, dei sulfamidici, dei chinoloni è stata effettuata tramite un metodo di LC-HRMS. Il metodo è stato convalidato conformemente alla decisione CE 657/2002.

Ogni pool di muscolo di *P. clarkii* liofilizzato è stato omogeneizzato da un miscelatore verticale B-400 (Büchi Labortechnik AG, Flawil Svizzera) prima dell'estrazione. Per ogni campione 5 ± 0.1 g sono stati messi su un tubo da 50 mL con 200 μ L di EDTA 0,1 M. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 10 mL di metanolo e sono stati agitati con vortex per 1 min. La soluzione è stata centrifugata a 3000 rpm per 10 min e il surnatante è stato filtrato a 0.45 μ m. Circa 4 mL della soluzione filtrata è stata portata a secco sotto flusso gentile di azoto e il residuo è stato risospeso con 1 mL di soluzione contenente acqua ultrapura e acido formico 0.1% prima dell'analisi LC-HRMS.

Le separazioni cromatografiche sono state effettuate come riportato in Cammilleri et al. (2019) utilizzando una colonna UHPLC a fase inversa Hypersil Gold (50 mm x 2.1 mm ID, 1.9 μ m).

L'analisi è stata eseguita su un sistema UHPLC (Thermo Fisher Scientific, California, U.S.A.) costituito da una pompa quaternaria ACCELA 1250 e da un autocampionatore ACCELA a + 6 °C. La fase mobile era costituita da eluente A (acqua + acido formico 0.1%) ed eluente B (metanolo + acido formico 0.1%), la durata totale di ogni singola analisi era di 15 min ad un flusso di 0.4 mL min⁻¹.

Come spettrometro di massa è stato impiegato un triplo quadruplo TSQ vantage (Thermo Fisher Scientific, California, USA) con modalità di ionizzazione elettrospray positiva (ESI+) con le seguenti condizioni: i) capillary temperature: 310°C; ii) spray voltage: 4500 V; iii) sheath gas pressure 40 psi; iv) auxiliary gas pressure 15 units. Il tempo di ritenzione (t_R), la massa accurata e la frammentazione distintiva sono stati utilizzati per identificare gli analiti (Tabella S6 del materiale supplementare).

Quotidianamente, prima dell'analisi, è stata effettuata una calibrazione esterna per la precisione di massa. Il software Thermo Xcalibur™ versione 4.0 è stato utilizzato per registrare ed esportare i dati di acquisizione. Le prestazioni del metodo sono state valutate per linearità, specificità ed esattezza in conformità della decisione 2002/657 della Commissione Europea.

Il limite di rilevazione (LOD) è stato calcolato con un rapporto segnale/rumore di 3, mentre il valore del limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato utilizzando un rapporto segnale/rumore di 10. Il test di linearità ha dato buoni risultati per tutti gli analiti testati ($R^2 > 0.995$). L'esattezza del recupero ha dato valori compresi tra l'86% e il 102%.

I risultati dell'analisi chimica degli antibiotici hanno mostrato che tutti i campioni di muscolo ed esoscheletro erano sotto il limite di rilevazione. Attendiamo i risultati relativi ai campioni di acqua. In ogni caso l'assenza di rilevazione di antibiotici nei campioni biologici suggerisce che i siti potrebbero non essere significativamente contaminati e/o che tali sostanze, una volta rilasciate in tali ambienti, si degradano rapidamente (Yang et al., 2021).

Le sostanze poli- e perfluoroalchiliche (PFAS)

A partire dalla seconda metà del secolo scorso, le peculiari proprietà fisico-chimiche delle molecole organiche fluorurate hanno dato origine alla loro ampia diffusione (Suja et al., 2009). Le sostanze poli- e perfluoroalchiliche (PFAS) sono molecole organiche contenenti diversi atomi di fluoro lungo lo scheletro carbonioso, da composti molto piccoli come l'acido trifluoroacetico (TFA): CF₃COOH a molto grandi come i polimeri fluorurati come il politetrafluoroetilene (PTFE) o "Teflon" e il polivinilidene fluoruro (PVDF). Secondo la nuova definizione dell'OECD i PFAS sono definiti come sostanze fluorurate che contengono almeno un gruppo metilico perfluorato (-CF₃) o gruppo metilenico perfluorato (-CF₂) (al quale non deve essere legato alcun atomo di idrogeno o

alogeno tra cloro, bromo e iodio) (Wang et al., 2021). I precursori di primo grado ad es. n-etil perfluorooctano sulfonamminetanolo (EtFOSE) nell'ambiente degradano a precursori di secondo grado che hanno una stabilità intermedia fino a dare origine agli acidi perfluorurati caratterizzati dall'essere molto persistenti e per questo denominati “forever chemical” (Miner et al., 2021; Zhang et al., 2022).

I PFAS, grazie alla loro stabilità termica, chimica e alla loro natura anfifilica, sono stati utilizzati per svariate applicazioni commerciali ed in diversi prodotti come: refrigeranti, agenti espandenti di schiuma, soppressori di incendi, nonché in tessuti fluoropolimerici, vernici e altri materiali con caratteristiche di resistenza all'olio e all'acqua (Suja et al., 2009; Lesch et al., 2017; Sunderland et al., 2019). Insieme alla loro diffusione industriale, questa famiglia di prodotti chimici, che comprende più di 5000 composti alifatici altamente fluorurati, ha trovato diverse applicazioni anche nei prodotti di consumo, dalle pentole e tappeti agli imballaggi alimentari, all'elettronica (Buck et al., 2011; Lesch et al., 2017).

Sfortunatamente negli ultimi decenni, il loro sottovalutato impatto ambientale ha causato un aumento del livello di contaminazione ambientale da PFCs, e in particolare da PFAS. Infatti, a causa della stabilità chimica del legame C-F, i PFAS sono resistenti alla degradazione (idrolisi, fotolisi e degradazione microbica) e rappresentano una delle principali classi di inquinanti organici persistenti (POPs) diffusi nell'ambiente (Buck et al., 2011; Zhang et al., 2019). Tuttavia, il loro comportamento ambientale, bioaccumulo e attività tossicologica, di solito seguono percorsi diversi rispetto ad altri POPs ampiamente studiati (ad es. composti organoclorurati e organobromurati) (Conder et al., 2019). Nel nuovo millennio, le autorità, i laboratori di ricerca e le industrie si stanno impegnando nell'obiettivo comune di contrastare l'impatto ambientale attraverso il monitoraggio e la regolamentazione di questi inquinanti (Kwiatkowski et al., 2020).

Queste attività includono la valutazione dello stato qualitativo dell'ambiente, misurato da bioindicatori ecologici in particolare negli ambienti acquatici. Per minimizzare l'impatto dei PFAS negli ecosistemi acquatici e lungo le reti trofiche, è fondamentale verificarne la presenza nelle varie matrici ambientali e studiarne gli effetti sugli organismi (Savoca et al., 2021; 2023a; Savoca & Pace, 2021). Come altri inquinanti organici persistenti, anche i PFAS a causa del trasporto atmosferico e oceanico, sono stati trovati in aree lontane dalla fonte di contaminazione (Prevedouros et al., 2006; Vierke et al., 2012). In questo contesto, al giorno d'oggi, le acque e i sedimenti sono considerati depositi di questi inquinanti persistenti (Sunderland et al., 2019).

Il ciclo di trasporto del PFAS dipende dalla struttura e dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza stessa, nonché da diverse condizioni ambientali, tra cui il contenuto di carbonio organico,

la temperatura, la salinità, ecc. (Martin et al., 2003). Nonostante i PFAS e i loro precursori possano essere soggetti a una varietà di trasformazioni ambientali e biologiche in diversi compartimenti (Martin et al., 2006), possiedono un notevole potenziale di bioaccumulo che varia sia in base alla natura dei diversi composti, che in base all'organismo coinvolto (con differenze intraspecifiche e interspecifiche) al sesso, allo stadio di sviluppo e ai meccanismi di trasporto attivo (EFSA, 2008, 2018). Nella maggior parte degli studi che riportano matrici contaminate da PFAS, oltre all'acido perfluorooctansolfonico (PFOS), l'acido perfluorooctanoico (PFOA) è tra i composti più frequentemente rilevati a livelli di concentrazione significativamente superiori di altri inquinanti fluorurati (Kar et al., 2017; Dai & Zheng, 2019; Guo et al., 2019). Probabilmente questa situazione continuerà ad essere registrata nonostante il PFOS nel 2008 e il PFOA (suoi sali e relativi composti) nel 2019 siano stati aggiunti nell'allegato A della Convenzione di Stoccolma (Schulz et al., 2020).

Come già accennato, il destino dei PFAS, dopo il loro rilascio nell'ambiente, dipende dai loro processi di trasporto, ripartizione e trasformazione. In questo contesto risulta fondamentale valutare tali processi e il conseguente rischio di esposizione degli organismi (dalla base fino all'apice della catena alimentare), soprattutto considerando che l'assunzione avviene spesso per ingestione. Infatti, oltre all'esposizione legata alla contaminazione dell'ambiente fisico (aria, acqua, suolo), l'ingestione diretta di un alimento contaminato aumenta notevolmente l'assimilazione dell'inquinante (Suja et al., 2009). A tal proposito, uno studio molto recente condotto in Tanzania ha riportato livelli di contaminazione da PFAS nel pesce e nei frutti di mare tali da esporre coloro che li consumano ad una quantità tripla di PFOS, rispetto alla dose tollerabile (Groffen et al., 2021). Similmente in Italia invece, uno studio simile ha riportato livelli di contaminazione di PFAS nei pesci (cefalo (*Mugil cephalus*), sgombro atlantico (*Scomber scombrus*), platessa (*Pleuronectes platessa*), nasello (*Merluccius merluccius*) e branzino (*Dicentrarchus labrax*)) al di sopra della dose giornaliera tollerabile per la dieta dei bambini (Barbarossa et al., 2016). In questo contesto, nonostante l'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) abbia identificato più di 4500 sostanze correlate ai PFAS (Costello & Lee, 2019), solo alcune di esse (< 20) vengono regolarmente analizzate e monitorate, sottovalutando così la reale esposizione ad esse. Infatti, nel caso degli organismi acquatici è stato stimato che la percentuale di composti organofluorurati non identificati può variare dal 30 al 90% del totale delle sostanze fluorurate estratte dalle matrici organiche oggetto di analisi (Spaan et al., 2020; 2021). A ciò si aggiunge che i livelli di contaminazione dei prodotti ittici sono anche dovuti ai loro processi di conservazione e trasformazione ed aumentano con la crescente domanda ben lontana dall'essere soddisfatta (Thompson & Darwish, 2019). Inoltre, il 9 luglio 2020 l'Autorità Europea per la Sicurezza

Alimentare (EFSA) ha adottato un parere sul rischio per la salute umana connesso alla presenza di sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti, stabilendo una dose settimanale tollerabile (DST) di 4.4 ng/kg di peso corporeo alla settimana per la somma di PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS.

Per tutte le ragioni descritte in questo paragrafo, al fine di garantire la sicurezza alimentare ai consumatori ed in generale per la salute di tutti gli ecosistemi (specialmente quelli acquatici particolarmente coinvolti), considerando l'ingente diffusione dei PFAS nell'ambiente, è necessario valutare gli effetti dell'esposizione a queste sostanze attraverso esperimenti condotti in condizioni controllate e svolgere attività di monitoraggio costanti ed estese in ambiente naturale.

Nonostante l'elevata sensibilità strumentale mostrata dai bassi limiti di rilevazione (Tabella S7) le indagini hanno evidenziato che i risultati delle analisi di tutti i PFAS in tutte le matrici erano sotto tale limite. Questo dato conferma che gli ambienti di campionamento non sono contaminati da questi composti organofluorurati. Allo stesso modo, visto il Regolamento (UE) 2022/2388 della Commissione del 7 dicembre 2022 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di sostanze perfluoroalchiliche nei prodotti alimentari, per gli analiti indagati, i muscoli di *P. clarkii* risultano sicuri dal punto di vista del consumo alimentare.

Gli esteri dell'acido ftalico (PAEs)

Gli ftalati sono esteri dell'acido ftalico (PAEs), ottenuti per esterificazione dell'anidride dell'acido ftalico (acido 1,2-benzendicarbossilico) e un alcol (a catena lineare o ramificata). Queste sostanze a temperatura ambientale sono per lo più liquidi poco volatili generalmente incolori e inodori (Staples et al., 1997). I PAEs possiedono una struttura di base costituita da un acido 1,2-benzendicarbossilico e si differenziano chimicamente per le diverse catene laterali R1 e R2 (che caratterizzano le loro proprietà chimico-fisiche). Gli ftalati sono sostanze chimiche organiche sintetiche utilizzate per varie applicazioni industriali, tipicamente usate come additivi nelle plastiche (agenti plastificanti) ad esempio nel cloruro di polivinile (PVC) (Savoca et al, 2023b). In particolare, queste molecole conferiscono flessibilità, resistenza e modellabilità al prodotto finale grazie alla loro capacità di interagire con il polimero con il quale sono mescolate. Le proprietà fisiche e quindi il loro campo di applicazione dipendono dalla lunghezza e dalla ramificazione delle catene laterali. Alcuni ftalati sono aggiunti a prodotti commerciali d'uso comune per trattenere il colore o la fragranza (come i profumi), aumentare la lucentezza, o, nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, per favorirne il rilascio controllato (Latini, 2005). Alcuni esempi di prodotti nei quali vengono aggiunti sono: pellicole, teloni, rivestimenti per pavimenti, tubi, cavi, vernici, lacche, smalti per unghie, spray per

capelli, lubrificanti senza grasso, agenti antischiuma, solventi ma anche come vettori liquidi in pesticidi e cosmetici (Manikkam et al., 2013; Savoca et al., 2023b).

Tra tutte le possibili fonti di contaminazione, sicuramente, l'impatto delle plastiche nelle diverse matrici ambientali ha contribuito e contribuisce alla loro diffusione ubiquitaria. Questi, favoriti dalle piccolissime dimensioni delle micro- e nanoplastiche possono facilmente passare dai bassi livelli trofici della catena alimentare come il plancton, ai pesci e quindi fino all'uomo. Queste sostanze non sono legate covalentemente al materiale plastico, pertanto, vengono facilmente rilasciate nelle matrici organiche con le quali entrano a contatto (Savoca et al., 2018; 2021a). La loro presenza è stata documentata anche in regioni lontane dalle aree di produzione a causa del trasporto atmosferico ed oceanico che contribuisce in modo significativo alla loro diffusione (Zeng et al., 2008). Ciò vale soprattutto per gli ftalati a catena corta che sono, per questo motivo, più volatili (Zeng et al., 2008). Infatti, ad eccezione del di-metil ftalato (DMP), che ha il peso molecolare più basso, gli altri componenti di questa classe di composti sono inclusi generalmente tra i composti organici semivolatili (SVOCs) e si ripartiscono tra la fase gassosa e quella particolata (Staples et al., 1997).

I PAEs sono stati rilevati in aria, ambienti marini e continentali (Zeng et al., 2008; Paluselli et al., 2019). Inoltre, sono stati rilevati in svariati organismi terrestri e marini (Babu & Wu, 2010; Savoca et al., 2018; 2021a), così come negli esseri umani (Net et al., 2015).

Esperimenti condotti su animali hanno dimostrato che gli ftalati interferiscono con i normali processi fisiologici mediati da ormoni essenziali per riproduzione, crescita e sviluppo portando alla cosiddetta "sindrome da ftalati" (Hliseníková et al., 2020).

Tra gli effetti si annoverano una produzione ridotta di spermatozoi, la sterilità, mammelle non del tutto sviluppate, il criptorchidismo, l'ipospadia e altre malformazioni degli organi di riproduzione (Lottrup et al., 2006). L'esposizione a PAEs inoltre influisce negativamente sul comportamento e sulla salute dell'adulto e della sua prole (Dutta et al., 2020) causando, tra gli altri, epatotossicità, stress ossidativo, alterazioni del neurosviluppo, aberrazioni genetiche e riprogrammazione epigenetica (Grindler et al., 2018; Dutta et al., 2020; Xu et al., 2020).

Gli effetti sopra descritti sono sintomatici di un disturbo dell'equilibrio ormonale, pertanto, gli ftalati che mostrano questi effetti vengono denominati perturbatori, interferenti o distruttori endocrini. In base agli effetti e ai livelli di esposizione i PAEs possono essere considerati fattori di rischio per molte patologie multifattoriali (ad esempio patologie riproduttive, alterazioni dello sviluppo ed embriogenesi, incluso il successo schiusa delle uova, sindromi metaboliche e tumori) (Liu et al., 2009; Sparling, 2016; Dutta et al., 2020).

La pericolosità degli ftalati deriva proprio dalla loro capacità di interagire con le membrane cellulari, la quale è giustificata dalla loro affinità verso porzioni organiche. La commissione europea e l'agenzia di protezione ambientale hanno riconosciuto questi come inquinanti prioritari per l'elevata presenza e tossicità ambientale (Jergensen et al., 2019).

Anche se non inseriti nella lista di Stoccolma, gli ftalati condividono molte delle caratteristiche delle sostanze chimiche presenti e possono essere considerate inquinanti organici persistenti. Infatti, nel 2016 l'Agenzia Europea per le Sostanze Chimiche (ECHA) ha preparato una proposta di restrizione di quattro ftalati: di-2-etilesilftalato (DEHP), benzilbutilftalato (BBP), d-n-butilftalato (DBP) e di-iso-butilftalato (DIBP). Annunciata nel dicembre del 2018, la restrizione concernente la registrazione, valutazione, autorizzazione e restrizione delle sostanze chimiche (REACH) dell'UE è entrata in vigore il 7 luglio 2020 e stabilisce che "le quattro sostanze saranno limitate a una concentrazione pari o inferiore allo 0.1% in peso singolarmente o in qualsiasi combinazione (Hilber & Gabbert, 2020).

I limiti di rilevazione così come le singole sostanze ricercate sono riportati in Tabella S8. Ad eccezione di due campioni di acqua (Lago Rosamarina: BBP = 0.079 mg L⁻¹ e Gorgo Basso BBP = 0.029 mg L⁻¹) tutti i campioni e matrici mostravano risultati sotto il limite di rilevazione.

Dal punto di vista dell'inquinamento ambientale, l'assenza di ftalati nei sedimenti (limiti di legge: D.lgs. n°152 del 03/04/2006 GU n°88 del 14/04/06 All.5: V Parte IV Tab.1/A) e i bassi livelli di concentrazione trovati negli unici due campioni di acqua contaminati relativi a due siti su tre (un campione contaminato sui tre prelevati per ciascun sito) non costituisce motivo di particolare attenzione, inoltre il BBP non è considerato inquinante prioritario nel D.lgs. 172/2015. Per quanto riguarda i margini di tolleranza per la sicurezza alimentare, l'EFSA ha stabilito la dose di assunzione giornaliera tollerabile (Dgt) per un gruppo di cinque ftalati (DBP, BBP, DEHP, DINP, DDP) è per primi quattro di 50 µg kg⁻¹ di peso corporeo al giorno, per il DDP di 150 mg kg⁻¹.

Quindi, relativamente all'analisi dei gamberi del nostro studio, considerata l'assenza di contaminazione e i limiti normativi, i risultati ottenuti per i campioni di muscolo non destano preoccupazioni e pertanto possono essere considerati sicuri per fini alimentari.

I pesticidi

Il termine "pesticidi" è comunemente usato come sinonimo di prodotti fitosanitari ma comprende anche prodotti come i biocidi, che non sono destinati sì all'uso su piante, ma servono a debellare organismi nocivi e portatori di malattie come insetti, ratti e topi. I prodotti fitosanitari sono pesticidi che vengono utilizzati principalmente per mantenere in buona salute le colture e impedire loro di

essere distrutte da malattie e infestazioni. Comprendono erbicidi, fungicidi, insetticidi, acaricidi, fitoregolatori e repellenti (<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/pesticides>).

I pesticidi si dividono in:

- pesticidi chimici che contengono sostanze attive sintetiche nonché coformulanti e adiuvanti
- pesticidi non chimici di origine biologica (ad esempio microrganismi, macroorganismi invertebrati, semiochimici, estratti vegetali) o di origine minerale (es. rame). I pesticidi non chimici sono normalmente consentiti nell'agricoltura biologica (<https://www.nbst.it/1644-pesticidi-impatto-ambientale-effetti-sulla-salute-europa.html>)

L'inquinamento da pesticidi guida la perdita di biodiversità in Europa e provoca un calo significativo delle popolazioni di insetti (uno dei principali motori del declino degli impollinatori), minacciando il ruolo fondamentale che svolgono nella produzione alimentare.

I pesticidi sono intrinsecamente dannosi per gli organismi viventi (anche quelli formulati per uno specifico parassita) in quanto influenzano i processi ecologici e rendono gli ecosistemi meno diversificati e resistenti ai disturbi. L'esposizione ai pesticidi, diventati sempre più efficaci a basse concentrazioni, è legata a un'ampia gamma di effetti diretti (sia letali che non letali) e indiretti sulla biodiversità, contribuendo al declino delle popolazioni di svariate specie animali e vegetali (Schulz et al., 2021; Mamy et al., 2022).

La dieta è la principale fonte di esposizione ai pesticidi a causa dei residui riscontrabili sugli alimenti anche di origine animale (Carvalho, 2017) o sull'acqua potabile.

Sono stati stabiliti collegamenti tra l'esposizione ai pesticidi e l'aumento del rischio di diverse malattie croniche, tra cui: vari tipi di tumori, disturbi neurologici, malattie cardiovascolari, ritardi nello sviluppo, effetti sulla capacità riproduttiva e sulla sterilità, problemi cognitivi, respiratori (<https://www.nbst.it/1644-pesticidi-impatto-ambientale-effetti-sulla-salute-europa.html>).

Considerando l'elevata frequenza di residui di pesticidi riscontrata nei lavori di biomonitoraggio ambientale, anche in diversi tessuti di animali acquatici come i crostacei (Zhou et al., 2008), risulta necessario effettuare indagini con lo scopo di valutare sia la salute dell'ambiente che il potenziale rischio connesso al consumo di prede/cibi contaminati da parte di altri animali o dell'uomo.

Come osservato per le altre due classi di inquinanti organici (PFAS e ftalati) anche per i pesticidi non sussistono preoccupazioni né dal punto di vista ambientale (limiti per i sedimenti: D.lgs. n°152 del 03/04/2006 GU n°88 del 14/04/06 All.5: V Parte IV Tab.1/A; limiti per le acque: D.lgs. 172/2015), né dal punto di vista della sicurezza alimentare (limiti di legge dei residui di pesticidi nei cibi sono trattati nel Regolamento (CE) 396/2005). Infatti, nessuno dei campioni di acque, sedimento

e muscolo di *P. clarkii* era contaminato da queste sostanze. I pesticidi ricercati e i limiti di rilevabilità analitica sono mostrati in Tabella S9.

Le cianotossine

I cianobatteri sono un gruppo morfologicamente molto vario di procarioti fotosintetici, diffusi in tutti gli habitat acquatici. Durante determinati periodi stagionali, particolari condizioni favorevoli in termini di presenza di sostanze nutrienti (azoto e fosforo), di temperatura, di irraggiamento solare e di scarso rimescolamento delle masse di acqua portano alla rapida proliferazione di colonie algali con origine di estese fioriture (“bloom”) (Volante & Fumagalli, 2007). In alcuni casi, specie tossiche come *Planktothrix rubescens* sono diventate dominanti in seguito alla combinazione di processi di riduzione del carico trofico di laghi altamente eutrofizzati e riscaldamento superficiale delle acque (es. nel Lago di Bourget, in Francia) (Jacquet et al., 2005).

In queste condizioni, oltre a creare danni estetici e a causare fenomeni di anossia dannosi per gli ecosistemi, possono produrre biotossine costituite da centinaia di peptidi secondari dette cianotossine. Le cianotossine più conosciute sono si annoverano le microcistine (>100 varianti conosciute), le nodularine, le cilindrospermopsine, le anatosine e le saxitossine ed altre generalmente epatotossiche, neurotossiche e promotori tumorali (Testai et al., 2016a; 2016b; Buratti et al., 2017). Le microcistine vengono prodotte dalla maggior parte delle specie di *Microcystis* e da alcune specie di *Anabaena*, da *Planktothrix agardhii* e *Planktothrix rubescens*. Sono molecole stabili e persistenti, a causa della loro struttura ciclica, che possono quindi persistere nell’ambiente anche per periodi relativamente lunghi soprattutto in assenza di luce. Gli esseri umani possono essere esposti alle cianotossine tramite ingestione (acqua potabile e balneabile, attraverso la catena alimentare acquatica) (Volante & Fumagalli, 2007). Inoltre, i cambiamenti climatici si riflettono su una serie di parametri ambientali che agiscono da catalizzatori per le fioriture di cianobatteri e la conseguente produzione di cianotossine influenzando inoltre anche dal punto di vista evolutivo la tossicità delle diverse specie. Il problema ha ormai una dimensione notevole e numerose istituzioni nazionali ed internazionali sono interessate al problema. La contaminazione da cianotossine può considerarsi un valido esempio di come un problema tipicamente ambientale possa diventare anche un problema di sicurezza alimentare, sia per la loro presenza nell’acqua potabile, sia per la loro capacità di biomagnificazione lungo la catena alimentare e quindi negli alimenti.

Considerando il crescente interesse in questo settore e considerando i precedenti studi condotti su alcune zone umide siciliane che hanno mostrato un’elevata presenza di microcistine prodotte da

M. aeruginosa e *P. rubescens* (Naselli-Flores et al., 2007) emerge la chiara necessità di effettuare analisi chimiche finalizzate sulle matrici edibili oggetto del presente progetto.

I campioni di muscolo liofilizzato di *P. clarkii* con e senza intestino sono stati inviati per le analisi delle cianotossine (di cui fanno parte le microcistine), e riceveremo a breve i risultati.

WP7.2 Analisi per l'utilizzazione in prodotti biotecnologici

Oltre alle analisi per la determinazione della qualità delle carni condotte sulla porzione edibile (il muscolo), sono state effettuate delle analisi sulla porzione non edibile, ossia sugli esoscheletri, per valutare il possibile utilizzo e quindi valorizzazione di questo materiale normalmente considerato di scarto ("waste"). Sono stati messi a punto dei protocolli per la produzione delle farine alimentari, su queste sono state svolte delle analisi per valutare la loro attività biologica e quindi il loro possibile utilizzo nella mangimistica di acquacoltura e non solo. Inoltre, è stata valutata la possibilità di estrarre dalle stesse farine le molecole bioattive di chitosano e astaxantina. Al fine di ottimizzare le estrazioni in termini di resa e qualità del prodotto, sono state condotte varie prove per riuscire a identificare le condizioni di reazione ideali. Una volta ottenute le biomolecole isolate è stata eseguita anche su queste, come sulle farine, una valutazione dell'attività biologica, al fine di valutare le possibili applicazioni commerciali.

Per fare ciò inizialmente ci siamo basati su protocolli di estrazione precedentemente svolti con buona resa su *Aristaeomorpha foliacea* e *Parapenaeus longirostris* (Soultani et al., 2016; Mauro et al., 2022). Abbiamo pertanto condotto varie prove modificando per ogni fase le condizioni di reazione (tempo di reazione, temperatura, concentrazione reagenti, etc.) al fine di ottimizzare le estrazioni in termini di resa e qualità del prodotto.

WP7.2a Messa a punto di protocolli per la produzione di farine alimentari

Le farine sono state ottenute partendo dagli esoscheletri degli esemplari dei tre siti di interesse, i quali dopo il loro campionamento sono stati conservati a $-20\pm C$. Dopo il congelamento, gli esoscheletri sono stati essiccati in stufa e successivamente polverizzati. Al fine di ottenere delle farine con una buona granulometria e un buon livello di umidità, e nell'ottica di scalare il processo a livello industriale, trovando un buon compromesso tra tempi e costi di lavorazione, sono state effettuate differenti prove di essiccazione variando i tempi e le temperature di trattamento. Sono state fatte delle prove anche di liofilizzazione degli esoscheletri. Il metodo migliore ha previsto una temperatura di $60\pm C$ per 48 ore in stufa prima della successiva polverizzazione degli stessi.



Esoscheletri di P. clarkii prima (sinistra) e dopo essiccamento (destra)



Campioni di farina di P. clarkii provenienti da 3 diversi siti. In alto P. clarkii delle Risaie di Cuccumella; in basso a destra P. clarkii del Gorgo Basso (R.N.O. Gorgi Tondi); in basso a sinistra P. clarkii del Lago Rosamarina.

WP7.2b. Messa a punto di protocolli per l'estrazione di molecole bioattive - Chitosano

Sulle base delle farine è stata effettuata l'estrazione del chitosano. Per mettere a punto il protocollo di estrazione, ci siamo basati su un protocollo utilizzato in precedenza dal nostro gruppo di ricerca su farine di *Aristaeomorpha foliacea* (Mauro et al. 2022).

Tale protocollo prevede la realizzazione di 4 steps: deproteinizzazione, demineralizzazione, decolorazione e deacetilazione. Per l'estrazione dalle farine di *P. clarkii* gli step fondamentali sono stati mantenuti, mentre sono state apportate delle modifiche sulle condizioni di reazione, in quanto sono state svolte diverse prove per trovare le migliori condizioni di tempo, temperatura e concentrazione dei reagenti, al fine di ottimizzare la resa e la qualità del prodotto. Al contempo sono state effettuate delle estrazioni di chitosano da *A. foliacea* per confrontare quantitativamente la resa del prodotto ottenuto dalle due specie. Di seguito le diverse fasi descritte nel dettaglio.

Deproteinizzazione: In questa fase grazie al trattamento con una soluzione alcalina i legami chimici tra chitina e proteine vengono idrolizzati (Hosney et al. 2022). Questo serve per permettere alle catene polipeptidiche di passare in soluzione, mentre la chitina insolubile in acqua rimane nel residuo solido, così dopo aver centrifugato è possibile allontanare le proteine dal campione semplicemente scartando il surnatante. Nel nostro caso è stata utilizzata una soluzione acquosa di NaOH, sono state svolte diverse prove variando sia i tempi di reazione sia la concentrazione di NaOH utilizzata. Il risultato migliore è stato ottenuto utilizzando lo stesso protocollo di *A. foliacea*, quindi una soluzione al 3% in rapporto 1:10 (p/v), incubando la polvere per due ore a 65–70° C sotto agitazione. La sospensione così ottenuta, dopo raffreddamento, è stata centrifugata e il surnatante è stato scartato, in modo da allontanare le proteine denaturate, successivamente sul residuo solido sono stati eseguiti dei lavaggi in acqua distillata per allontanare il reagente in eccesso. La polvere ottenuta è stata essiccata per una notte a 60° C. Un dato di notevole importanza è stato che la resa del prodotto secco ottenuto dai 3 campioni di *P. clarkii* è stata analoga, uguale al 70%, mentre la resa di *A. foliacea* è stata notevolmente inferiore, ovvero del 35%.



Campioni di P. clarkii dei diversi siti dopo la fase di deproteinizzazione; dall'alto verso il basso: Lago Gorghi Tondi, Risaie di Cuccumella, Lago Rosamarina.

Demineralizzazione: Lo scopo di questo passaggio è quello di rimuovere i minerali, poiché gli esoscheletri dei crostacei sono ricchi di carbonato di calcio. A tal proposito, è stata usata una soluzione diluita di acido cloridrico per convertire i sali di carbonato in anidride carbonica e sali di cloruro più solubili (Seenuvasan et al. 2020). In particolare, il campione è stato trattato con una soluzione di HCl 1M per 1 ora a temperatura ambiente, in un rapporto di 1:15 (p/v). Sono state condotte varie prove aumentando la temperatura a 50, 60 e 70°C, ma ciò non ha comportato un significativo aumento della resa finale della reazione. Al termine del tempo previsto la sospensione ottenuta è stata centrifugata, il surnatante è stato scartato allontanando così i minerali presenti in soluzione, sul residuo solido sono stati effettuati dei lavaggi fino a completa neutralizzazione. Questo residuo è stato essiccato per una notte a 60° C. In questa fase la resa media del prodotto secco per i campioni di *P. clarkii* è scesa al 21% mentre la resa di *A. foliacea* è stata del 14%. La notevole perdita di peso nei campioni di *P. clarkii* è da attribuire all' elevato contenuto di minerali nell'esoscheletro (Hamdi, 2011). Non sono state osservate differenze significative tra i campioni di *P. clarkii* dei diversi siti.



Campioni di P. clarkii dei diversi siti dopo la fase di demineralizzazione; dall'alto verso il basso: Lago Gorgi Tondi, Lago Rosamarina, Risaie di Cuccumella.

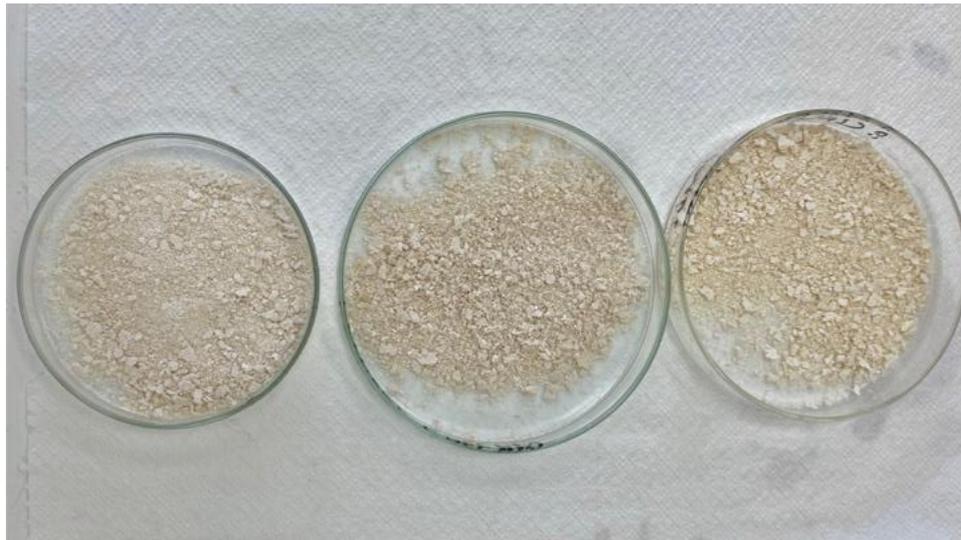
Decolorazione: Il campione secco è stato sospeso in una soluzione acquosa di NaClO al 3% a 25 °C per 2 ore in un rapporto di 1:10 (p/v). Successivamente la sospensione è stata centrifugata, il surnatante scartato, il residuo solido è stato lavato con acqua distillata e poi essiccato per una notte a 60°C. Sono state condotte varie prove per trovare il giusto tempo di reazione e la giusta molarità di NaClO da utilizzare. Rispetto alle condizioni utilizzate per decolorare il campione di *A. foliacea* è stato necessario aumentare notevolmente sia la concentrazione di NaClO sia il tempo di reazione; infatti, il protocollo su cui ci siamo basati prevede l'utilizzo di una soluzione allo 0,315% di NaClO per 5 minuti, condizioni che non permettono minimamente di ottenere un grado soddisfacente di decolorazione per i campioni di *P. clarkii* di tutti e tre i siti. Al termine di questa fase è stata ottenuta la chitina, con una resa media per i campioni di *P. clarkii* del 16,5 %, e per *A. foliacea* del 12%.



*Chitina estratta da campioni di *P. clarkii* dei diversi siti; dall'alto verso il basso: Gorgi Tondi, Lago Rosamarina, Risaie di Cuccumella.*

Deacetilazione: Questa reazione è stata effettuata per ottenere il chitosano dalla chitina ottenuta in precedenza. È stata utilizzata una soluzione alcalina concentrata a elevata temperatura per deacetilare alcuni gruppi amminici NH_2 - della chitina, riuscendo così a ottenere il chitosano. Le condizioni di reazione hanno determinato il grado di deacetilazione del chitosano ottenuto, proprietà da cui dipendono le sue caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche come: solubilità, attività antiossidante, antibatterica e antitumorale. Per questa ragione, per valutare se in specie diverse i gradi di deacetilazione potessero cambiare in seguito allo stesso trattamento, per i campioni di chitina ottenuti da *P. clarkii* e da *A. foliacea* sono state usate le stesse condizioni di temperatura, tempo di reazione e concentrazione di NaOH. In particolare, i campioni sono stati incubati in una soluzione acquosa di NaOH al 50% a 90°C per 5 ore in un rapporto di 1:15 (p/v) e dopo il raffreddamento il residuo solido ottenuto è stato lavato con acqua distillata ed essiccato a 60°C . La resa media di

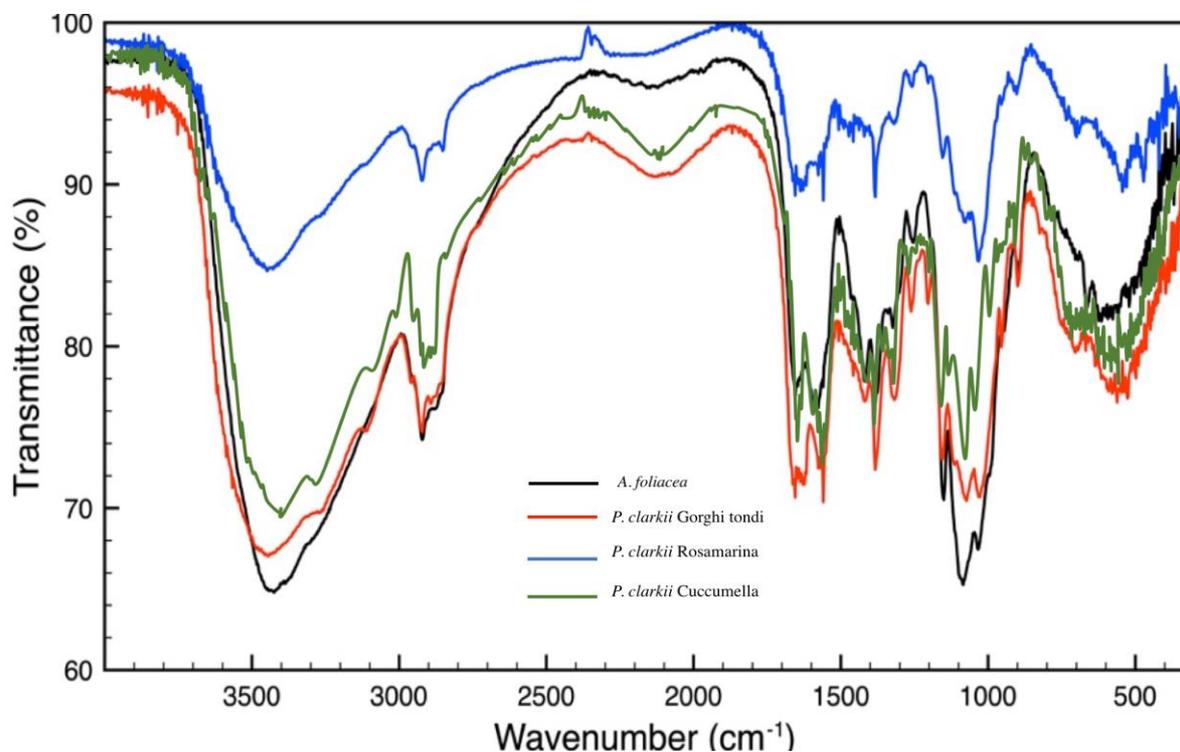
chitosano ottenuto dai campioni di *P. clarkii* è risultata pari all'11,5% e non sono state osservate differenze significative di resa fra i campioni di *P. clarkii* dei tre siti. Tale valore è risultato significativamente superiore alla resa di chitosano ottenuto da *A. foliacea* che invece è risultato pari all'8%.



Campioni di chitosano estratto dalle farine di esoscheletri di *P. clarkii* dei tre siti (da destra a sinistra: Lago Rosamarina, Lago Gorghetti, Risaie di Cuccumella)

Le rese di chitina e chitosano ottenute da *P. clarkii* sono state confrontate con le rese riportate in letteratura da altri autori, i quali hanno estratto queste biomolecole da altre specie di crostacei sia d'acqua dolce che marina. Le rese di chitosano ottenute dai nostri campioni sono risultate superiori rispetto a quelle ottenute dal *Potamon potamios* (Bolat et al., 2010) e dal *Metapenaeus monoceros* (Chakrabarti, 2002), simili a quelle ottenute per *Chionoecetes opilio* (Hertrampf & Piedal-Pascual, 2000) e *Callinectes sapidus* (Pandharipandese & Bhagat, 2016; Jabeen et al., 2021; Narudin et al., 2020), e inferiori a quelle ottenute per *Penaeus monodon* (Islam et al. 2020). Le differenze riscontrate sono imputabili non soltanto al contenuto caratteristico di chitosano presente in ogni specie e quindi ad una correlazione specie-specifica, ma anche ai diversi protocolli di estrazione messi in atto. Infatti, in tutti i protocolli effettuabili sono presenti delle variabili che possono incidere notevolmente sulla resa del prodotto finale. Le diverse condizioni di reazione a cui vengono sottoposti i campioni determinano per esempio un differente grado di deacetilazione, fattore che influenzando la solubilità del prodotto potrebbe influenzare anche la perdita di massa del prodotto stesso. Ad ogni modo le rese sono risultate soddisfacenti per inserire il *P. clarkii* nel contesto di estrazione del chitosano.

Le polveri di chitosano ottenute sono state analizzate utilizzando uno spettrometro Jasco FT/IR 420. Come previsto, il chitosano estratto dai *P. clarkii* e *A. foliacea* non ha mostrato differenze in termini di composizione chimica e pertanto il protocollo di estrazione utilizzato è risultato soddisfacente. Gli spettri dei campioni di chitosano di *P. clarkii* del Lago Rosamarina (linea blu), del Lago Gorghi Tondi (linea rossa), e delle Risaie di Cuccumella (linea verde), non mostrano differenze significative. Le uniche differenze osservate nello spettro del campione di Rosamarina (linea blu) sembrano essere dovute ai livelli di umidità del campione, probabilmente dovuti a residui di solvente rimasto dal processo di estrazione.



Spettro FT-IR dei campioni di chitosano ottenuti da P. clarkii

WP7.2b. Messa a punto di protocolli per l'estrazione di molecole bioattive - Astaxantina

Per estrarre l'astaxantina è stato usato il protocollo d'estrazione in metanolo (Lopez et al. 2006). Anche in questo caso si è iniziato utilizzando un protocollo di riferimento messo a punto anche su *Aristeomorpha foliacea* dal nostro gruppo di ricerca. L'estrazione è stata eseguita partendo dalle tre farine di esoscheletri di *P. clarkii*. Per ogni campione sono state utilizzate aliquote di 200 mg di farina sospese in 1,5 ml di metanolo; successivamente i campioni sono stati sonicati per 2 minuti per favorire la solubilizzazione e quindi l'estrazione della molecola bioattiva. Al termine della

sonicazione, i campioni sono stati centrifugati a 4000 g per 10 minuti a 25°C e il surnatante recuperato. È stata anche eseguita una prova d'estrazione con etanolo, ma i risultati ottenuti sono stati analoghi. Successivamente i campioni sono stati conservati in condizioni di oscurità a 6-8°C e analizzati nel più breve tempo possibile. Su tutti i campioni la concentrazione di astaxantina è stata dosata mediante un'analisi UHPLC-HESI-MS (Ultra-High Performance-Liquid-Chromatography, Heated ElectroSpray and Mass Spectrometry) con un sistema Dionex Ultimate 3000 (Dionex Softron GmbH, Germering, Germania) dotato di un autocampionatore. Il software di riferimento è stato Chromeleon 7.2. È stato utilizzato inoltre lo spettrometro di massa Q-Exactive (Thermo Scientific, Brema, Germania). Il rilevamento si basava sull'utilizzo dello standard di riferimento dell'astaxantina (purezza $\geq 97\%$ HPLC, Sigma Aldrich) ed è stato valutato dal browser Quan/Qual Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). La linearità della risposta è stata verificata con soluzioni contenenti astaxantina a quattro concentrazioni da 0,4 a 1 ppm.



*Astaxantina estratta da farine di *P. clarkii* dei diversi siti*

Le rese di astaxantina ottenute dalle tre farine di esoscheletri dei *P. clarkii* dei tre siti non hanno mostrato differenze significative. Nei tre casi le quantità di astaxantina sono risultate pari a 1.20, 1.50 e 1.10 ppm ($\mu\text{g/g}$) rispettivamente per i campioni di Rosamarina, Gorghi Tondi e Cuccumella.

Tale valore risulta significativamente superiore al valore di astaxantina ottenuto dal nostro gruppo di ricerca su *A. foliacea*. Con lo stesso protocollo e con lo stesso sistema di analisi UHPLC-HESI-MS infatti i valori di astaxantina sono risultati pari a 0,95 ppm ($\mu\text{g/g}$). D'altro canto, le rese di *P. clarkii* sono risultate inferiori a quelle riportate in letteratura da altri autori su *Parapenaeus longirostris* (Saultani et al., 2016), *Pandalus borealis* (Dave et al., 2020), *Callinectes bellicosus* e *Callinectes sapidus* (Montoya et al. 2021). Anche in questo caso i risultati potrebbero essere dovuti sicuramente ad un effetto specie-specifico o a delle differenze nei protocolli di estrazioni. Altre valutazioni in merito saranno sicuramente effettuate. Nonostante questo, le rese di astaxantina sono risultate soddisfacenti e i protocolli utilizzati economicamente vantaggiosi. Questo permette di inserire il *P. clarkii* nel contesto dei taxa dai quali è possibile l'estrazione di molecole bioattive con grande valore commerciale.

WP7.2c Valutazione delle attività biologiche e dell'utilizzazione dei rispettivi composti isolati.

Dopo aver messo a punto i protocolli per la produzione di farine e per l'estrazione di chitosano e astaxantina è stata valutata la loro attività biologica. Tale valutazione ha avuto lo scopo sia di analizzare la qualità dei prodotti ottenuti che di valutarne le possibili applicazioni in prodotti biotecnologici. Su campioni di farine, chitosano e astaxantina, di *P. clarkii* del Lago Rosamarina, di *P. clarkii* del Lago Gorghi Tondi e di *P. clarkii* delle Risaie di Cuccumella sono state valutate la capacità riducente e l'attività scavenger sui radicali liberi. I risultati, anche in questo caso, sono stati paragonati con i risultati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo su farine, astaxantina e chitosano di *A. foliacea*.

	TPC Mg GAE/g	FRAP Mg AAE/g	DPPH $\mu\text{mol TE/g}$	ABTS ⁺ $\mu\text{mol TE/g}$
Farine				
<i>P. clarkii</i> (Gorghetti tondi)	1.62±0.02 ^a	1.10±0.02 ^a	4.32±0.06 ^a	6.77±0.23 ^a
<i>P. clarkii</i> (Rosamarina)	1.90±0.04 ^b	1.21±0.03 ^a	4.93±0.07 ^a	6.89±0.14 ^a
<i>P. clarkii</i> (Cuccumella)	1.68±0.10 ^a	1.17±0.07 ^a	4.55±0.05 ^a	6.83±0.43 ^a
<i>A. foliacea</i>	5.04±0.12 ^c	2.47±0.12 ^b	9.25±0.11 ^b	14.31±0.43 ^b
Astaxantina				
<i>P. clarkii</i> (Gorghetti tondi)		4.31±0.11 ^a	8.43±0.16 ^a	9.40±0.23 ^a
<i>P. clarkii</i> (Rosamarina)		4.27±0.24 ^a	7.91±0.19 ^a	9.76±0.14 ^a
<i>P. clarkii</i> (Cuccumella)		4.40±0.12 ^a	8.83±0.11 ^a	9.52±0.26 ^a
<i>A. foliacea</i>		4.95±0.12 ^b	9.37±0.11 ^b	10.12±0.26 ^a
Chitosano				
<i>P. clarkii</i> (Gorghetti tondi)		2.70±0.06 ^a	2.11±0.06 ^a	
<i>P. clarkii</i> (Rosamarina)		3.20±0.09 ^a	2.22±0.07 ^a	
<i>P. clarkii</i> (Cuccumella)		3.00±0.07 ^a	2.13±0.05 ^a	
<i>A. foliacea</i>		3.10±0.07 ^a	2.16±0.11 ^a	

^aTPC, (Total Phenol Content) contenuto totale di fenoli; ^bFRAP, (Ferric Reducing Antioxidant Power) potere antiossidante basato sulla riduzione dello ione ferrico; ^cDPPH[•], (2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl) 2,2-difenil-1-picrilidrazil; ^dABTS⁺, (2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzoThiazoline-6-Sulfonic acid)) acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico); ^eGAE; (Gallic Acid Equivalent) equivalenti di acido gallico; ^fAAE; (Acid Ascorbic Equivalent) equivalenti di acido ascorbico; ^gTE; (Trolox Equivalent) equivalenti di trolox.

I valori presenti in tabella sono dati dalla media di tre determinazioni effettuate in doppio \pm DS (ANOVA a una via, associata al test di Tukey). I valori nella stessa colonna con la stessa lettera non sono significativamente diversi per $p < 0,05$.

Valutazione biologica su farine, astaxantina, chitosano, ottenute da esoscheletri di *P. clarkii*

Sulle farine sono stati valutati: il contenuto fenolico totale (TPC) (reazione Folin-Ciocalteu), il potere antiossidante basato sulla riduzione dello ione ferrico (FRAP) e l'attività scavenger dei radicali (ABTS e DPPH). Tutte le farine hanno un contenuto fenolico soddisfacente, i valori di TPC ottenuti per i campioni di Gorghetti Tondi e Cuccumella non hanno mostrato differenze significative tra loro, mentre il valore ottenuto per il campione di Rosamarina è risultato significativamente più elevato. Il valore di TPC ottenuto per i campioni di tutti i siti è risultato essere superiore rispetto ai

valori ottenuti da Elkhodary et al. (2017) su esemplari di *P. clarkii* del fiume Nilo. I risultati ottenuti e le differenze riscontrate potrebbero essere dovuti alla diversa alimentazione degli animali nei diversi siti. Se confrontati con i livelli di contenuto fenolico delle farine di *A. foliacea* questi risultavano significativamente inferiori. Anche in questo caso, le differenze riscontrate potrebbero dipendere da diversi fattori: la tipologia di habitat, la tipologia di alimentazione e la tipologia di specie (marina e di acqua dolce). Per quanto concerne il potere antiossidante e l'attività scavenger dei radicali (FRAP, DPPH e ABTS), non sono state osservate differenze significative tra le farine dei *P. clarkii* dei diversi siti sebbene i livelli di attività riscontrati siano risultati soddisfacenti. Inoltre, i livelli più elevati sono stati riscontrati nelle farine dei *P. clarkii* di Rosamarina in particolare modo nel caso del saggio ABTS e DPPH. Questi stessi livelli di attività biologica sono risultati significativamente superiori nelle farine di *A. foliacea* rispetto alle farine dei *P. clarkii*. I livelli superiori di attività antiossidante nelle farine dei *P. clarkii* di Rosamarina e nelle farine di *A. foliacea* potrebbero essere correlati agli elevati livelli di contenuto fenolico riscontrati e descritti in precedenza e quindi alle diverse tipologie di alimentazione delle specie considerate e dei siti considerati.

Per quanto riguarda l'astaxantina, sono state condotte le stesse analisi rispetto alle farine con l'eccezione della valutazione del contenuto fenolico totale (TPC) poiché in questo caso il campione da analizzare era la singola molecola bioattiva estratta. In tutti i test effettuati (FRAP, DPPH, ABTS) sono stati osservati importanti livelli di attività biologica e valori particolarmente elevati sono stati osservati per tutti i campioni nel saggio ABTS. Su tutte le analisi effettuate non sono state evidenziate differenze significative tra i campioni di astaxantina estratta da *P. clarkii* di siti diversi. Sebbene tutte le attività biologiche siano risultate più elevate nell'astaxantina estratta da *A. foliacea* differenze significative sono state osservate solo per i saggi FRAP e DPPH. In letteratura, solo Elkhodary et al., (2017) e Hamdi et al. (2022) hanno valutato i valori DPPH dell'astaxantina di *P. clarkii*. I valori ottenuti dai nostri campioni sono risultati superiori rispetto ai valori ottenuti sugli individui di *P. clarkii* del Nilo. A tal proposito trova conferma la supposizione che la differenza dei siti e quindi della tipologia di alimentazione possa influenzare queste proprietà inserendo le molecole bioattive ottenute dai *P. clarkii* siciliani in un contesto di applicazioni cosmetiche, biologiche, mediche, farmaceutiche e nutrizionali.

Per quanto riguarda i campioni di chitosano, sono state valutate solamente le attività DPPH e FRAP poiché per quanto riguarda il contenuto fenolico il chitosano, come l'astaxantina, è una singola molecola estratta per la quale non è possibile valutare questo parametro, mentre per quanto riguarda

l'analisi ABTS l'insolubilità del chitosano in ambiente acquoso ne ha impedito l'esecuzione. Per tutti i campioni di chitosano sono stati ottenuti valori soddisfacenti sia in termini di DPPH che di FRAP. In questo caso i valori migliori sono stati ottenuti dall'analisi FRAP. Sebbene non emergano differenze significative nelle attività DPPH e FRAP tra i campioni di chitosano derivati da *P. clarkii* dei diversi siti, in generale, per entrambe le analisi si sono riscontrati livelli leggermente superiori nei campioni ottenuti dagli esemplari del Lago Rosamarina. In merito ai valori FRAP e DPPH rilevati sul chitosano non sono state osservate differenze significative fra i valori ottenuti da *P. clarkii* e *A. foliacea*. I valori di attività antiossidante del chitosano estratto dai nostri campioni sono risultati essere in linea con i risultati di altri studi presenti in letteratura, condotti su *P. clarkii* di altre aree geografiche (Omar et al., 2022).

In conclusione, in termini di conservazione della biodiversità, la promozione dell'uso di una specie esotica per il consumo umano potrebbe rappresentare una strategia vincente per la sua eradicazione/gestione, rendendola una valida risorsa come già dimostrato per organismi quali *Pterois volitans*, *Macrobrachium nipponense*, *Callinectes sapidus*, *Portunus segnis* (Gokoglu e Yerlikaya, 2003; Küçükgülmez et al., 2006; Zotti et al., 2016; Lavajoo et al., 2018; Castro-González et al., 2019).

I sottoprodotti di *P. clarkii* potrebbero contribuire ad aumentare la redditività di questa risorsa, in quanto dalla parte non edibile è possibile ottenere delle farine con un soddisfacente contenuto fenolico, con buone attività antiossidanti e di *scavenger* di radicali liberi; tali prodotti possiedono le potenzialità per essere utilizzati come additivi alimentari in mangimi per l'acquacoltura e non solo. Inoltre, questo materiale di scarto può essere utilizzato come sorgente di molecole bioattive. Sono stati infatti messi a punto dei protocolli estrattivi che permettono di ottenere chitosano e astaxantina con una buona resa; per entrambe le molecole la resa ottenuta da *P. clarkii* è stata significativamente superiore a quella ottenuta da *A. foliacea*. Dalle valutazioni delle attività biologiche sia il chitosano che l'astaxantina hanno mostrato un'ottima attività antiossidante e di radical scavenger con possibilità di applicazioni cosmetiche, nutraceutiche e/o mediche.

I costi per la produzione delle farine, dell'astaxantina e del chitosano compenserebbero i costi per lo smaltimento dei rifiuti, contribuendo a ridurre l'impatto ambientale di questo materiale di scarto.

WP8: Attività di divulgazione

Nell'ambito del LXXXII Congresso dell'Unione Zoologica Italiana (<https://www.uzionlus.it/82-congresso-uzi-2023/>), sono stati presentati i primi risultati legati al censimento della distribuzione del gambero rosso della Luisiana tramite trappolaggio in un poster dal titolo: “Distribution updates of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Sicily” a firma di Faraone F.P., Vecchioni L., Arizza V., Arculeo M. & F. Marrone (Allegato 1 alla presente relazione). Inoltre, sono stati presentati i primi risultati legati al potenziale uso del gambero rosso della Luisiana per la produzione di farine animali e molecole bioattive in un poster dal titolo: “Aquatic shrimps as a resources of bioactive molecules” a firma di Mauro M., Attanzio A., Giardina M.C., Barone G., Tesoriere L., Arizza V. & M. Vazzana (allegato 2 alla presente relazione).

Nell'ambito dell'edizione 2023 di BlueSeaLand (Mazara del Vallo, 18-21 ottobre), è stata realizzata una tavola rotonda dal titolo “Censimento, caratterizzazione, controllo e valorizzazione del gambero rosso della Luisiana (*Procambarus clarkii*) in Sicilia”, moderata dal prof. Federico Marrone, responsabile scientifico del progetto, dove sono stati presentati parte dei risultati del Progetto (allegato 3 alla presente relazione).

Infine, in accordo a quanto stabilito nella convenzione, nel mese di Novembre 2023 verrà realizzato un workshop per la divulgazione dei risultati del progetto e verrà distribuita una brochure illustrativa e descrittiva di tutte le attività e dei risultati ottenuti nell'ambito dello stesso. L'evento avrà luogo nella Chiesa di Sant'Antonino, all'interno del complesso monumentale di Palazzo Steri, a Palermo.



Due momenti della tavola rotonda dedicata al Progetto nell'ambito dell'evento BlueSeaLand

Bibliografia

- AOAC International, 2012. Official methods of analysis of AOAC international (19th ed.).
- Ahmad R.S., Imran, A., Hussain M.B., 2018. Nutritional Composition of Meat. In Meat Science and Nutrition; IntechOpen: London, UK, pp. 61–77.
- Ayas Deniz, 2016. The effects of season and sex on the nutritional quality of muscle types of the blue crab *Callinectes sapidus* and the swimming crab *Portunus segnis*. Natural and Engineering Sciences, 1 (2): 1-14.
- Al-Manhel A. J., Al-Hilphy A. R. S., & A. K. Niamah, 2018. Extraction of chitosan, characterization and its use for water purification. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 17 (2): 186-190.
- Alcorlo, P., Otero, M., Crehuet, M., Baltanás, A., & Montes, C. (2006). The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiamar (SW Spain). Science of the Total Environment, 366(1), 380-390.
- Ali, H., & Khan, E. (2018a). What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’—proposal of a comprehensive definition. Toxicological & Environmental Chemistry, 100(1), 6-19.
- Ali, H., & Khan, E. (2018b). Bioaccumulation of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in freshwater fish. Risk to human health. Environmental chemistry letters, 16(3), 903-917.
- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. Journal of chemistry, 2019.
- Ambati R. R., Phang S. M., Ravi S., & R.G. Aswathanarayana, 2014. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. Marine drugs, 12(1): 128-152.
- Andreansyah, I. & R. Ridwanto, 2022. (Formulation of hand sanitizer gel based on chitosan shell of freshwater lobster (*Cherax quadricarinatus*). NSMRJ: Nusantara Scientific Medical Research Journal 1.1: 09-17.
- Aquiloni, L., Martín, M.P., Gherardi, F. & J. Diéguez-Uribeondo, 2011. The North American crayfish *Procambarus clarkii* is the carrier of the oomycete *Aphanomyces astaci* in Italy. Biological Invasions, 13: 359–367.
- Ariano, A., Scivicco, M., D’Ambola, M., Velotto, S., Andreini, R., Bertini, S., ... & Severino, L. (2021). Heavy metals in the muscle and hepatopancreas of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in Campania (Italy). Animals, 11(7), 1933.
- Babu, B., & Wu, J. T. (2010). Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria. The Science of the total environment, 408(21), 4969–4975.
- Barbarossa, A., Gazzotti, T., Farabegoli, F., Mancini, F. R., Zironi, E., Busani, L., & Pagliuca, G. (2016). Assessment of Perfluorooctane Sulfonate and Perfluorooctanoic Acid Exposure Through Fish Consumption in Italy. Italian journal of food safety, 5(4), 6055.
- Barrento S., Marques A., Teixeira B., Vaz-Pires P., Nunes M. L., 2009. Nutritional quality of edible tissues of the European lobster *Homarus gammarus* and the American lobster *Homarus americanus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(9): 3645-3652.

- Bolat Y., Bilgin Ş., Günlü A., Izci L., Koca S. B., Çetinkaya S., & H.U. Koca, 2010. Chitin-chitosan yield of freshwater crab (*Potamon potamios*, Olivier 1804) shell. *Pakistan Veterinary Journal*, 30(4): 227-31.
- Bölgen, N., Demir, D., Öfkeli, F., & S. Ceylan, 2016. Extraction and characterization of chitin and chitosan from blue crab and synthesis of chitosan cryogel scaffolds. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 3(3): 131-144.
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691.
- Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., de Voogt, P., Jensen, A. A., Kannan, K., Mabury, S. A., & van Leeuwen, S. P. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integrated environmental assessment and management*, 7(4), 513–541.
- Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, et al. Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action, and human health toxicological risk evaluation. *Arch Toxicol* 2017;91:1049-130.
- Cammilleri et al. 2019 Tetracycline Residues in Bovine Muscle and Liver Samples from Sicily (Southern Italy) by LC-MS/MS Method: A Six-Year Study.
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and energy security*, 6(2), 48-60.
- Castro-González M.I., Caballero-Vázquez J.A., Guerra-Infante F.M. & M. López-Hurtado, 2019. Analysis of the chemical composition of the lionfish *Pterois volitans* as a food strategy for its control. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 47: 841–844.
- Cerasino, L., & Salmaso, N. (2020). Co-occurrence of anatoxin-a and microcystins in Lake Garda and other deep subalpine lakes: Co-occurrence of anatoxin-a and microcystins in Lake Garda. *Advances in Oceanography and Limnology*, 11(1).
- Chakrabarti R., 2002. Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. *Food Biotech*, 16: 81–90.
- Chaturvedi, P., Shukla, P., Giri, B. S., Chowdhary, P., Chandra, R., Gupta, P., & Pandey, A. (2021). Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environmental research*, 194, 110664.
- Clardy, J., Fischbach, M. A., & Currie, C. R. (2009). The natural history of antibiotics. *Current biology*: CB, 19(11), R437–R441.
- Conder, J. M., Hoke, R. A., De Wolf, W., Russell, M. H., & Buck, R. C. (2008). Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environmental science & technology*, 42(4), 995–1003.
- Costello, M.C.S., Lee, L.S. (2019). Sources, Fate, and Plant Uptake in Agricultural Systems of Per- and Polyfluoroalkyl Substances. *Current Pollution Reports*, 2020
- Cruz M.J. & R. Rebelo, 2007. Colonization of freshwater habitats by an introduced crayfish, *Procambarus clarkii*, in Southwest Iberian Peninsula. *Hydrobiologia*, 575: 191-201.
- D'angelo, S. & M. Lo Valvo, 2003. On the presence of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda Cambaride), in Sicily, Italy. *Naturalista siciliano*. 5, 425-428.

- D'Angelo, S., Ferrante, E., Lo Valvo, M., 2008. Primi risultati sull'attività di contenimento del gambero rosso della Louisiana nella Riserva Naturale "Lago Preola e Gorgi Tondi" (Sicilia). Memorie della Società Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale di Milano, 36: 55.
- Dai, Z., Zeng, F. (2019). Distribution and Bioaccumulation of Perfluoroalkyl Acids in Xiamen Coastal Waters. Journal of Chemistry, 2019, 2612853
- Dave D., Liu Y., Pohling J., Trenholm S., Murphy W., 2020. Recovery of astaxanthin from Atlantic shrimp (*Pandalus borealis*) processing materials. Bioresource Technology Reports, 11: 100535.
- Dutta, S., Haggerty, D. K., Rappolee, D. A., & Ruden, D. M. (2020). Phthalate Exposure and Long-Term Epigenomic Consequences: A Review. Frontiers in genetics, 11, 405.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Nebbia, C. S., Oswald, I. P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A. C., Vleminckx, C., Vollmer, G., ... Schwerdtle, T. (2018). Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. EFSA journal. European Food Safety Authority, 16(12), e05194.
- Elkhodary G., Beltagy D. M., Samak N. M., Abdul-Aziz K. K., Mona M. H., 2017. Evaluation of the antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of the carotenoid extracted from the exoskeletons of *Erugosquilla massavensis* and *Procambarus clarkii*. International Journal of Cancer and Biomedical Research, 1(1): 11-20.
- Feisal & Montarop, 2010. Chitin research revisited. Marine Drugs, 8 (7): 1988-2012.
- Gherardi F, Aquiloni L, Diéguez-Urbeondo J, Tricarico E, 2011. Managing invasive crayfish: is there any hope? Aquatic Sciences 73: 185-200.
- Gherardi, F., Aquiloni, L., Cianfanelli, S., Tricarico, E., 2014. Specie aliene. In: Lencioni V, Rossaro B, Boggero A, Marziali L (a cura di) I macroinvertebrati lacustri - morfologia, tassonomia, ecologia e biomonitoraggio, Quaderni del Museo Tridentino di Scienze Naturali. 6/1, pp. 51-96.
- Gökođlu N. & Yerlikaya P., 2003. Determination of proximate composition and mineral contents of blue crab (*Callinectes sapidus*) and swim crab (*Portunus pelagicus*) caught off the Gulf of Antalya. Food Chemistry, 80(4): 495-498.
- Goretti, E., Pallottini, M., Ricciarini, M. I., Selvaggi, R., & Cappelletti, D. (2016). Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels. Science of the Total Environment, 559, 339-346.
- Grenni, P., Ancona, V., & Caracciolo, A. B. (2018). Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. Microchemical Journal, 136, 25-39.
- Grindler, N. M., Vanderlinden, L., Karthikraj, R., Kannan, K., Teal, S., Polotsky, A. J., Powell, T. L., Yang, I. V., & Jansson, T. (2018). Exposure to Phthalate, an Endocrine Disrupting Chemical, Alters the First Trimester Placental Methylome and Transcriptome in Women. Scientific reports, 8(1), 6086.
- Groffen, T., Rijnders, J., van Doorn, L., Jorissen, C., De Borger, S. M., Lutikhuis, D. O., de Deyn, L., Covaci, A., & Bervoets, L. (2021). Preliminary study on the distribution of metals and persistent organic pollutants (POPs), including perfluoroalkylated acids (PFAS), in the aquatic environment near Morogoro, Tanzania, and the potential health risks for humans. Environmental research, 192, 110299.

- Guo, M., Zheng, G., Peng, J., Meng, D., Wu, H., Tan, Z., Li, F., & Zhai, Y. (2019b). Distribution of perfluorinated alkyl substances in marine shellfish along the Chinese Bohai Sea coast. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 54(4), 271–280.
- Hamdi, S.A., 2011. Analysis of muscle and exoskeletal extracts of fresh and marine crustaceans *Procambarus clarkii* and *Erugosquilla massavensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5.13: 1589-1597.
- Hamdi S., Elsayed N., Algayar M., Ishak V., Ahmed M., Ahmed S., Abd El-Ghany M., 2022. Biological extraction, HPLC quantification and medical applications of astaxanthin extracted from the lobster exoskeleton by-product "*Procambarus clarkii*". *Biology*, 11 (8): 1215.
- Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., Goycoolea, F.M., 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications *Crit. Rev. Food Science and Nutrition*, 46 (2): 185-196.
- Hosney, A., Ullah, S., Barčauskaitė, K., 2022. A review of the chemical extraction of chitosan from shrimp wastes and prediction of factors affecting chitosan yield by using an artificial neural network. *Marine Drugs*, 20: 675.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J. C., Molina, J. A., Esbrí, J. M., & Lorenzo, S. (2006). The Almadén district (Spain): anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites. *Science of the Total Environment*, 356(1-3), 112-124.
- Hilber, I., & Gabbert, S. (2020). Choosing the best for preventing the worst: A structured analysis of the selection of risk management options in REACH restriction dossiers. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 118, 104809.
- Hlišníková, H., Petrovičová, I., Kolena, B., Šidlovská, M., & Sirotkin, A. (2020). Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *International journal of environmental research and public health*, 17(18), 6811.
- Hogan, C. M. (2010). Heavy metal. *Encyclopedia of Earth*. National Council for Science and the Environment. Eds E. Monosson & C. Cleveland, Washington DC.
- Hogan, L. S., Marschall, E., Folt, C., & Stein, R. A. (2007). How non-native species in Lake Erie influence trophic transfer of mercury and lead to top predators. *Journal of Great Lakes Research*, 33(1), 46-61.
- Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J., Yazawa, K., 2006. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29 (10): 2106-2110.
- Islam A., Islam M.S., Zakaria M.U.M.A., Paul S.C. & Mamun A.A., 2020. Extraction and Worth Evaluation of Chitosan from Shrimp and Prawn Co-products. *American Journal of Food Technology*, 15: 43-48.
- Jabeen F., Younis T., Sidra S., Muneer B., Nasreen Z., Saleh F., Abbas A.S., 2021. Extraction of chitin from edible crab shells of *Callinectes sapidus* and comparison with market-purchased chitin. *Brazilian Journal of Biology*, 83.

- Jacquet S, Briand J-F, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, et al. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following restoration of the largest natural French lake (Lac du Bourget). *Harmful Algae* 2005;4(4):651-72.
- Jergensen, T., Cusmano, D., & Roy, N. M. (2019). Di-butyl phthalate (DBP) induces craniofacial defects during embryonic development in zebrafish. *Ecotoxicology (London, England)*, 28(8), 995–1002.
- Jjemba P. K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63(1), 113–130.
- Kar, S., Sepúlveda, M. S., Roy, K., & Leszczynski, J. (2017). Endocrine-disrupting activity of per- and polyfluoroalkyl substances: Exploring combined approaches of ligand and structure based modeling. *Chemosphere*, 184, 514–523.
- Kerby J.L., Riley S.P.D., Kats L.B., Wilson P., 2005. Barriers and flow as limiting factors in the spread of an invasive crayfish (*Procambarus clarkii*) in southern California streams. *Biological Conservation*, 126: 402-409.
- Küçükgülmez A., Çelik M., Yanar Y., Ersoy B., Çikrikçi M., 2006. Approximate composition and mineral content of breast, claw and hepatopancreas meat of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *IJFST*, 41: 1023–1026.
- Kwiatkowski, C. F., Andrews, D. Q., Birnbaum, L. S., Bruton, T. A., DeWitt, J. C., Knappe, D., Maffini, M. V., Miller, M. F., Pelch, K. E., Reade, A., Soehl, A., Trier, X., Venier, M., Wagner, C. C., Wang, Z., & Blum, A. (2020). Scientific Basis for Managing PFAS as a Chemical Class. *Environmental science & technology letters*, 7(8), 532–543.
- Latini G. (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 361(1-2), 20–29.
- Lavajoo F., Biuki N.A., Khanipour A., Mirzajani A., Akbarzadeh A., 2018. An Invasive Shrimp Species, *Machrobrachium nipponense*, in Anzali Wetland Demonstrated a Potential Source for Commercial Fishing. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 27: 975–985.
- Lesch, V., Bouwman, H., Kinoshita, A., & Shibata, Y. (2017). First report of perfluoroalkyl substances in South African Odonata. *Chemosphere*, 175, 153–160.
- Li J., Huang J., Li C., Zhang Y., Wang Y., Hou S., Li J., 2021. Evaluation of the nutritional quality of edible tissues (muscle and hepatopancreas) of *Procambarus clarkii* cultivated using biofloc technology. *Aquaculture Reports*, 19: 100586.
- Liu, S., Zhao, H., LehmLer, H. J., Cai, X., & Chen, J. (2017). Antibiotic Pollution in Marine Food Webs in Laizhou Bay, North China: Trophodynamics and Human Exposure Implication. *Environmental science & technology*, 51(4), 2392–2400.
- Liu, Y., Guan, Y., Yang, Z., Cai, Z., Mizuno, T., Tsuno, H., Zhu, W., & Zhang, X. (2009). Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology (London, England)*, 18(3), 293–303.
- Lo Parrino E., Ficetola G.F., Manenti R. & Falaschi M., 2020. Thirty years of invasion: the distribution of the invasive crayfish *Procambarus clarkii* in Italy. *Biogeographia – The Journal of Integrative Biogeography*, 35: 27–34.
- López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Gutiérrez-Coronado M.A., Ríos-Vázquez N.J., 2006. Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC Biomed. Chromatogr., 20: 981-984.

- Lottrup, G., Andersson, A. M., Leffers, H., Mortensen, G. K., Toppari, J., Skakkebaek, N. E., & Main, K. M. (2006). Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *International journal of andrology*, 29(1), 172–185.
- Loureiro T.G., Anastácio P., Araujo P.B., Souty-Grosset C., Almerào M.P., 2015. Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion: an overview. *Nauplius*, 23(10): 1-19.
- Maccarrone V., Filiciotto F., Buffa G., Di Stefano V., Quinci E.M., De Vincenzi G., Mazzola S. & Buscaino G., 2016. An invasive species in a protected area of southern Italy: the structure, dynamics and spatial distribution of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16: 401–412.
- Mamy, L., Pesce, S., Sanchez, W., Amichot, M., Artigas, J., Aviron, S., ... & Leenhardt, S. (2022). Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques. Rapport de l'expertise scientifique collective (Doctoral dissertation, INRAE; IFREMER).
- Manfrin C, Souty-Grosset C, Anastácio PM, Reynolds J, Giulianini PG, 2019. Detection and Control of Invasive Freshwater Crayfish: From Traditional to Innovative Methods. *Diversity* 11: 5.
- Manganelli, M., & Vichi, S. CIANOATTERI TOSSICI E CAMBIAMENTI CLIMATICI. Cambiamenti ambientali globali e salute, 19, 46.
- Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 8(1), e55387.
- Marino, F., Pretto, T., Tosi, F., Monaco, S., De Stefano, C., Manfrin, A., Quaglio, F., 2014. Mass Mortality of *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868) reared in Sicily (Italy): crayfish plague introduced in an intensive farming. *Freshwater Crayfish*, 20: 93–96.
- Martin, J. W., Ellis, D. A., Mabury, S. A., Hurley, M. D., & Wallington, T. J. (2006). Atmospheric chemistry of perfluoroalkanesulfonamides: kinetic and product studies of the OH radical and Cl atom initiated oxidation of N-ethyl perfluorobutanesulfonamide. *Environmental science & technology*, 40(3), 864–872.
- Martin, J. W., Mabury, S. A., Solomon, K. R., & Muir, D. C. (2003). Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental toxicology and chemistry*, 22(1), 196–204.
- Martín-Torrijos, L., Martínez-Ríos, M., Casabella-Herrero, G., Adams, S. B., Jackson, C. R., and Diéguez-Urbeondo, J., 2021. Chasing the crayfish plague: Southeastern United States as the center for *Aphanomyces astaci* diversity. *Scientific Reports*, 11: 9332.
- Mauro, M., Pinto, P., Settanni, L.; Puccio, V.; Vazzana, M.; Hornsby, B.L.; Fabbriozio, A.; Di Stefano, V.; Barone, G.; Arizza, V., 2022. Chitosan Film Functionalized with Grape Seed Oil—Preliminary Evaluation of Antimicrobial Activity. *Sustainability*, 14: 5410.
- Miner, K. R., Clifford, H., Taruscio, T., Potocki, M., Solomon, G., Ritari, M., Napper, I. E., Gajurel, A. P., & Mayewski, P. A. (2021). Deposition of PFAS 'forever chemicals' on Mt. Everest. *The Science of the total environment*, 759, 144421.
- Montoya J. M., Velazco Mata S., Acosta J. L., Herrera Cabrera B. E., López Valdez L. G., Reyes, C., Barrales Cureño J. H. Obtaining of astaxanthin from crab exoskeletons and shrimp head shells. *Biointerface Res. Appl. Chem*, (2021)11, pp. 13516-13523.
- Muthulingam, S., Sarojini, G., Dineshkumar, M., 2020. Recovery of chitosan from natural biotic waste. *Current developments in Biotechnology and Bioengineering*, 115-133.

- Nargis R., 2006. Seasonal variation in the chemical composition of the body flesh of the koi fish *Anabas testudineus* (Block) (Anabantidae, Perciformes). Bangladesh J.Sci. Res. Ind. 4: 219-226.
- Narudin N.A.H., Mahadi A.H., Kusriani E., Usman A., 2020. Chitin, chitosan and submicron-sized chitosan particles prepared from *Scylla serrata* shells. Materials International, 2 (2): 139-149.
- Naselli-Flores, L., Barone, R., Chorus, I., & Kurmayer, R. (2007). Toxic cyanobacterial blooms in reservoirs under a semiarid Mediterranean climate: the magnification of a problem. Environmental Toxicology: an International Journal, 22(4), 399-404.
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., & Ouddane, B. (2015). Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. Environmental science & technology, 49(7), 4019–4035.
- Nuc, Z., Brusotti, G., Catenacci, L., Grenha, A., Pontes, J.F., Pinto da Silva, J., Rosa da Costa, A.M., Moro, P., Milanese, C., Grisoli, P., Sorrenti, M., Dobrzycka-Krahel, A, Bonferoni, M.C., Caramella, C.M., 2023. *Pontastacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) and *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817) as New, Alternative Sources of Chitin and Chitosan. Water, 15: 3024
- Omar B. A., Elmasry R., Eita A., Soliman M. M., El-Tahan A. M., Sitohy M., 2022. Improved preparation of high-quality chitosan from *Procambarus clarkii* waste compared to traditional isolation of shrimp chitosan. Saudi Journal of Biological Sciences, 29(2): 911-919.
- Ottonello D., D'Angelo S., Oneto F., Malavasi S. & Zuffi M.A.L., 2017. Feeding ecology of the Sicilian pond turtle *Emys trinacris* (Testudines, Emydidae) influenced by seasons and invasive alien species. Ecological Research, 32: 71–80.
- Paluselli, A., Fauvelle, V., Galgani, F., & Sempéré, R. (2019). Phthalate Release from Plastic Fragments and Degradation in Seawater. Environmental science & technology, 53(1), 166–175.
- Pandharipandese S.L., Bhagat P.H., 2016. Synthesis of chitin from crab shells and its utilization in preparation of nanostructured film. International Journal of Science, Engineering and Technology Research, 5: 1378-1383.
- Pashkow F.J., Watumull D.G., Campbell C.L., 2008. Astaxanthin: A novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. Am. J. Cardiol., 101: 58D–68D.
- Pleadin J., Lesic T., Kresic G., Baric R., Bogdanovic T., Oraic D., Zrncic S., 2017. Nutritional quality of different fish species farmed in the Adriatic Sea. Italian Journal of Food Sciences, 29 (3).
- Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., & Korzeniowski, S. H. (2006). Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. Environmental science & technology, 40(1), 32–44.
- Rand, G. M. (Ed.). (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. CRC press.
- Ranga Rao, A. 2011. Production of astaxanthin from cultured green alga *Haematococcus pluvialis* and its biological activities (Doctoral dissertation, University of Mysore).
- Regolamento di esecuzione (UE) 2015/1415 della Commissione, del 20 agosto 2015, relativo all'autorizzazione dell'astaxantina come additivo per mangimi destinati a pesci, crostacei e pesci ornamentali. GU L 220 del 21.8.2015, pp. 7–10.
- Regolamento di esecuzione (UE) 2016/1141 della Commissione, del 13 luglio 2016, che adotta un elenco delle specie esotiche invasive di rilevanza unionale in applicazione del regolamento (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio. GU L 189 del 14.7.2016, pp. 4–8.



- Rosa R., & Nunes M. L., 2004. Nutritional quality of the red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), the pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus). *Journal of Food and Agricultural Science*, 84(1): 89-94.
- Sanchez Lopez, F. J., Gil Garcia, M. D., Martínez Vidal, J. L., Aguilera, P. A., & Garrido Frenich, A. (2004). Assessment of metal contamination in Donana National Park (Spain) using crayfish (*Procambarus clarkii*). *Environmental Monitoring and Assessment*, 93, 17-29.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725–759.
- Savoca, D., & Pace, A. (2021). Bioaccumulation, Biodistribution, Toxicology and Biomonitoring of Organofluorine Compounds in Aquatic Organisms. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6276.
- Savoca, D., Barreca, S., Lo Coco, R., Punginelli, D., Orecchio, S., & Maccotta, A. (2023b). Environmental Aspect Concerning Phthalates Contamination: Analytical Approaches and Assessment of Biomonitoring in the Aquatic Environment. *Environments*, 10(6), 99.
- Savoca, D., Melfi, R., Palumbo Piccionello, A., Barreca, S., Buscemi, S., Arizza, V., ... & Pace, A. (2021). Presence and biodistribution of perfluorooctanoic acid (PFOA) in *Paracentrotus lividus* highlight its potential application for environmental biomonitoring. *Scientific Reports*, 11(1), 18763.
- Savoca, D., Pace, A., Arizza, V., Arculeo, M., & Melfi, R. (2023a). Controlled uptake of PFOA in adult specimens of *Paracentrotus lividus* and evaluation of gene expression in their gonads and embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(10), 26094-26106.
- Schulz, K., Silva, M. R., & Klaper, R. (2020). Distribution and effects of branched versus linear isomers of PFOA, PFOS, and PFHxS: A review of recent literature. *The Science of the total environment*, 733, 139186.
- Schulz, R., Bub, S., Petschick, L. L., Stehle, S., & Wolfram, J. (2021). Applied pesticide toxicity shifts toward plants and invertebrates, even in GM crops. *Science*, 372(6537), 81-84.
- Selvaggi, R., Pallottini, M., Caldaroni, B., Dörr, A. J. M., Magara, G., Gravina, P., ... & Cappelletti, D. (2023). Sex and seasonal differences in metal accumulation of selected tissues in red swamp crayfish from Lake Trasimeno (Umbria, Italy). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(3), 6234-6244.
- Seenuvasan M., Sarojini G., & Dineshkumar M., 2020. Recovery of chitosan from natural biotic waste. In *Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, pp. 115-133.
- Senta, I., Terzic, S., & Ahel, M. (2013). Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water research*, 47(2), 705–714.
- Shaaban, E. A., Abdel Gawad, S. S., El-Feky, F. A., El-Sayed, A. A., & Mahmoud, N. H. (2017). Bioaccumulation of cadmium and lead in the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* (GIRARD 1982) from the River Nile, Egypt. *Al Azhar bulletin of Science*, 9, 219-233.
- Śmietana N., Panicz R., Sobczak M., Śmietana P., Nędzarek A., 2020. Spiny-cheeked shrimp, *Faxonius limosus* (Rafinesque, 1817), as an alternative food source. *Animals*, 11 (1), pp. 59.
- Souty-Grosset C, Anastácio P, Aquiloni L, Banha F, Choquer J, Chucoll C, Tricarico E, 2016. Impacts of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* on European aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologia* 58: 78-93.

- Shavandi A., Hu Z., Teh S., Zhao J., Carne A., Bekhit A., & Bekhit, A. E. D. A., 2017. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from squid pen chitosan extraction effluent. *Food chemistry*, 227: 194-201.
- Soultani, G., Strati, I.F., Zoumpoulakis, P., Miniadis-Meimaroglou, S., Sinanoglou, V.J., 2016. Evaluation of functional lipid constituents of red (*Aristaeomorpha foliacea*) and pink (*Parapenaeus longirostris*) shrimp. *Journal of Aquaculture Research Development*, 7: 452.
- Souty-Grosset C., Anastácio P., Aquiloni L., Banha F., Choquer J., Chucoll C., Tricarico E., 2016. Impacts of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* on European aquatic ecosystems and human well-being. *Limnologia*, 58: 78-93.
- Synowiecki J, Al-Khateeb NAAQ., 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Cragon cragon* processing discards. *J Food Chem.*, 68: 147–152.
- Spaan, K. M., van Noordenburg, C., Plassmann, M. M., Schultes, L., Shaw, S., Berger, M., Heide-Jørgensen, M. P., Rosing-Asvid, A., Granquist, S. M., Dietz, R., Sonne, C., Rigét, F., Roos, A., & Benskin, J. P. (2020). Fluorine Mass Balance and Suspect Screening in Marine Mammals from the Northern Hemisphere. *Environmental science & technology*, 54(7), 4046–4058.
- Spaan, K. M., van Noordenburg, C., Plassmann, M. M., Schultes, L., Shaw, S., Berger, M., Heide-Jørgensen, M. P., Rosing-Asvid, A., Granquist, S. M., Dietz, R., Sonne, C., Rigét, F., Roos, A., & Benskin, J. P. (2021). Correction to Fluorine Mass Balance and Suspect Screening in Marine Mammals from the Northern Hemisphere. *Environmental science & technology*, 55(9), 6518–6520.
- Sparling, D. W. (2016). *Ecotoxicology essentials: environmental contaminants and their bio-logical effects on animals and plants*. Academic Press.
- Staples, C. A., Adams, W. J., Parkerton, T. F., Gorsuch, J. W., Biggingers, G. R., Reiner, K. H. (1997). Aquatic Toxicity of Eighteen Phthalate Esters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(5), 875–891.
- Suarez-Serrano, A., Alcaraz, C., Ibanez, C., Trobajo, R., & Barata, C. (2010). *Procambarus clarkii* as a bioindicator of heavy metal pollution sources in the lower Ebro River and Delta. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(3), 280-286.
- Suja, F., Pramanik, B. K., & Zain, S. M. (2009). Contamination, bioaccumulation and toxic effects of perfluorinated chemicals (PFCs) in the water environment: a review paper. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 60(6), 1533–1544.
- Sunderland, E. M., Hu, X. C., Dassuncao, C., Tokranov, A. K., Wagner, C. C., & Allen, J. G. (2019). A review of the pathways of human exposure to poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) and present understanding of health effects. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 29(2), 131–147.
- Tee, Z.-B., Ibrahim, S., Teoh, C.-Y., 2022. Comparative study on the nutritional content and physical attributes of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) meats. *Research square*.
- Testai E, Buratti FM, Funari E, Manganelli M, Vichi S, Arnich N, et al. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. Parma: European Food Safety Authority; 2016a. (EFSA Supporting publication 2016:EN-998).

- Testai E, Scardala S, Vichi S, Buratti FM, Funari E. Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Crit Rev Toxicol* 2016b:1-35.
- Thompson, L. A., & Darwish, W. S. (2019). Environmental Chemical Contaminants in Food: Review of a Global Problem. *Journal of toxicology*, 2019, 2345283.
- Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F., 2017. Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1: e14625.
- Vecchioni, L., Faraone, F.P., Stoch, F., Arculeo, M. & Marrone, F., 2022. Diversity and distribution of the inland water decapods of Sicily (Crustacea, Malacostraca). *Diversity*, 14: 246.
- Vierke, L.; Staude, C.; Biegel-Engler, A.; Drost, W.; Schulte, C. (2012). Perfluorooctanoic acid (PFOA) – Main concerns and regulatory developments in Europe from an environmental point of view. *Environmental Sciences Europe*, 24, 16.
- Volante, M., & Fumagalli, R. Determinazione Rapida di Microcistine ed Anatoxina A in acqua di lago mediante estrazione in fase solida (SPE) interfacciata in-linea con HPLC/DAD. *DAD, Il Bollettino*, 2-2007.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., & Peakall, D. B. (2006). *Principles of Ecotoxicology*. by CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL.
- Wang, Z., Buser, A. M., Cousins, I. T., Demattio, S., Drost, W., Johansson, O., Ohno, K., Patlewicz, G., Richard, A. M., Walker, G. W., White, G. S., & Leinala, E. (2021). A New OECD Definition for Per- and Polyfluoroalkyl Substances. *Environmental science & technology*, 55(23), 15575–15578.
- Wang W., Xue C., & Mao X., 2020. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164: 4532-4546.
- Wöhler, L., Hoekstra, A.Y., Hogeboom, R.J., Brugnach, M., & Krol, M.S. (2020). Alternative societal solutions to pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124350.
- Xu, S., Zhang, H., Pao, P. C., Lee, A., Wang, J., Suen Chan, Y., Manno Iii, F., Wan Chan, S., Han Cheng, S., & Chen, X. (2020). Exposure to phthalates impaired neurodevelopment through estrogenic effects and induced DNA damage in neurons. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 222, 105469.
- Yang, Q., Gao, Y., Ke, J., Show, P. L., Ge, Y., Liu, Y., ... & Chen, J. (2021). Antibiotics: An overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. *Bioengineered*, 12(1), 7376-7416.
- Zeng, F., Cui, K., Xie, Z., Wu, L., Liu, M., Sun, G., Lin, Y., Luo, D., & Zeng, Z. (2008). Phthalate esters (PAEs): emerging organic contaminants in agricultural soils in peri-urban areas around Guangzhou, China. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 156(2), 425–434.
- Zhang Y., Yang B., Yang L., Jiang S., Lu J., & Lin L., 2023. Comparison of the nutritional qualities of pond prawn, rice paddy and wild prawn (*Procambarus clarkii*) meat. *Advances in Food Chemistry*, 2: 100272.
- Zhang, D. Q., Zhang, W. L., & Liang, Y. N. (2019). Adsorption of perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFASs) from aqueous solution - A review. *The Science of the total environment*, 694, 133606.



Università
degli Studi
di Palermo



mipaaf
ministero delle politiche
agricole alimentari e forestali



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

- Zhang, Z., Sarkar, D., Biswas, J. K., & Datta, R. (2022). Biodegradation of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A review. *Bioresource technology*, 344(Pt B), 126223.
- Zhou, R., Zhu, L., Chen, Y., & Kong, Q. (2008). Concentrations and characteristics of organochlorine pesticides in aquatic biota from Qiantang River in China. *Environmental Pollution*, 151(1), 190-199.
- Zotti M., Del Coco L., De Pascali S.A., Migoni D., Vizzini S., Mancinelli G., Fanizzi F.P., 2016. Comparative analysis of the proximate and elemental composition of the blue crab *Callinectes sapidus*, the warty crab *Eriphia verrucosa*, and the edible crab *Cancer pagurus*. *Heliyon*. 2, e00075.

Allegato 1

DISTRIBUTION UPDATES OF THE RED SWAMP CRAYFISH, *PROCAMBARUS CLARKII* (DECAPODA: CAMBARIDAE) IN SICILY

FRANCESCO PAOLO FARAONE¹, LUCA VECCHIONI¹, VINCENZO ARIZZA¹, MARCO ARCULEO¹, FEDERICO MARRONE¹

¹DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE BIOLOGICHE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DI PALERMO, VIA ARCHIRAFI 18, 90123 PALERMO

Introduction

Biological invasions are considered one of the major threats to biodiversity on a global scale. Introduced non-native species can affect ecosystems with both direct and indirect impacts. The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* Girard, 1852 is a cambarid crustacean native to the inland waters of North and Central America, and it is widely bred as pet and food resource. To date, the red swamp crayfish has reached a sub-cosmopolitan distribution due to its widespread anthropogenic introduction and strong invasive potential. The first Italian populations of the species were reported in the early 1990s in Piedmont, followed by its rapid expansion throughout the Italian peninsula. The first record in Sicily dates back to the early 2000s for the province of Trapani (western Sicily). Later on, *P. clarkii* was found in several other isolated localities, possibly due to multiple independent release events. Here we report the results obtained in the frame of a project aimed to assess the current distribution of the red swamp crayfish in Sicilian inland waters.

Materials and methods

To assess the distribution of *Procambarus clarkii* in Sicily, 88 water bodies spread across the Sicilian mainland were selected, also including those sites where the presence of the species was previously ascertained (Fig 1A). Sampling took place through visual census (live crayfish, exuviae, remains and burrows) and trapping sessions (through baited funnel trap and ARTs, *Artificial Refuge Traps*, Fig. 2).

Results

The survey is still on the way. To date, 60 sites were sampled. Present results confirmed the presence of the species in most of the locations where it was already known, with a single exception (Fig. 1B), where further surveys are planned to confirm the possible local extinction of the population. Three new sites with the presence of *P. clarkii* were identified (Fig. 1B): Villarsosa Reservoir (Enna), and Asinaro and Tellaro rivers (Siracusa). Based on some informal communications, the species should also be present in a fourth new site (i.e., Ponte Barca reservoir, Catania), where the actual presence of the species has yet to be confirmed. In some cases, the new observations are likely attributable to independent introduction events, in other cases are possibly due to active dispersal processes eased by the high local density of man-made water bodies linked with agricultural activities (e.g., irrigation channels, agricultural ponds, rice fields).

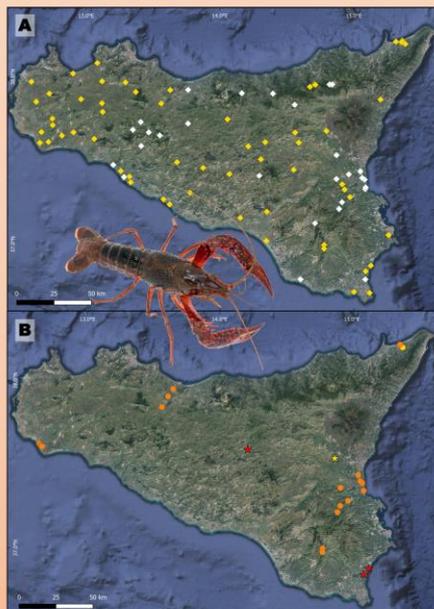


Fig. 1 A) Sampling effort. Yellow diamonds: sampled sites. White diamonds: sites still to be sampled. B) Sites of occurrence of *P. clarkii*. Orange dots: published sites. Yellow dot: not confirmed occurrence site. Red stars: novel occurrence sites. Yellow star: alleged novel site (yet to be confirmed).

Discussion

Comparing the results reported here with the extant data on the presence of *Procambarus clarkii* in Sicily, it appears clear that the expansion of the species is currently underway on the island, as already happened in other invaded areas. It is thus of paramount importance to monitor its spreading and its possible impact on the native Sicilian freshwater biota, with particular attention to threatened species as the Mediterranean trout, the freshwater crab *Potamon fluviatile*, and the native mussel *Unio mancus*, which occur syntopically with the red swamp crayfish in several Sicilian sites.

In addition, the possible role of *Procambarus clarkii* as a vector for the diffusion of the pathogenic chytrid fungus *Aphanomyces astaci* should also be carefully monitored.



Fig. 2 Sampling activities: A) Installation of funnel traps B) Crayfish trapping C) Signs of presence of the species D) Installation of ARTs.

Acknowledgements

This research is part of a project entitled "Censimento, caratterizzazione, controllo e valorizzazione del Gambero Rosso della Louisiana *Procambarus clarkii* in Sicilia" (CON-0570) and supported by the fund "PO FEAMP Sicilia 2014/2020" of the Regione Siciliana - Assessorato Agricoltura, Sviluppo Rurale e Pesca Mediterranea, Dipartimento Pesca Mediterranea. The management authorities of the sampled water bodies are kindly acknowledged for the support provided during the present research activity.

Allegato 2




Università degli Studi di Palermo

Interreg Italia-Malta

Bythos Extend




AQUATIC SHRIMPS AS A RESOURCES OF BIOACTIVE MOLECULES

MANUELA MAURO¹, ALESSANDRO ATTANZIO¹, ILENIA CONCETTA GIARDINA¹, GIAMPAOLO BARONE¹, LUISA TESORIERE¹,
 VINCENZO ARIZZA¹, MIRELLA VAZZANA¹

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università degli Studi di Palermo, Via Archirafi, 18, 90123 Palermo, Italy

Introduction

Aquatic crayfish depending on the species they can be invasive, bioindicators or used in human nutrition. Among these species, *Aristaeomorpha foliacea*, is an economically important marine species highly appreciated by consumers, while *Procambarus clarkii* is an invasive fresh water species responsible of the disappearance of the autochthonous species and of serious impacts on aquatic ecosystems (SOUTY-GROSSET et al., 2016). In the case of *A. foliacea*, the production of exoskeletons is considerable and constitute economic damage for disposal companies. In the case of *P. clarkii* being that it is a very dangerous species for freshwater ecosystems, to date it is very important carrying out eradication or control of its distribution. Using the exoskeleton of these species is possible to obtain bioactive molecules such as chitosan. All these aspects are part of the purpose of our study which is part of two project: the PO FEAMP 2014-2020 project entitled "Census, characterization, control and valorization of the Louisiana red shrimp (*Procambarus clarkii*) in Sicily" and Interreg Italia-Malta entitled "Bythos Extend".



Figure 1 Exoskeletons of *A. foliacea* (left) and *P. clarkii* (right)



Figure 2 Astaxanthin samples.



Figure 3 Flours and the corresponding chitosans obtained for each species (from top to bottom, *P. clarkii* of Rosamarina Lake, *P. clarkii* of Gorgi tondi Lake and *A. foliacea*).

Materials and methods

The preparations of the flours and the extractions of chitosan and astaxanthin from the exoskeletons have already been developed in the Bythos I project (MAURO et al., 2022, Figure 1, 2 and 3). These protocols were used to extract chitosan and astaxanthin from *P. clarkii* exoskeletons of different Sicilian lakes: the Rosamarina Lake and the Gorgi Tondi Lake. The chitosan samples obtained were analyzed using a Jasco FT/IR 420 spectrometer. On flours, were evaluated total phenolic content (Folin-Ciocalteu reaction), ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) and radical scavenging activity assays (ABTS and DPPH).

Results

As expected, chitosan extracted from *A. foliacea* and *P. clarkii* (Figure 4) showed no differences in terms of chemical composition. Between the two species of *P. clarkii* of the Rosamarina Lake (blue line Figure 3) and the Gorgi Tondi Lake (red line Figure 3), the only differences observed seem to be due to the humidity levels of the sample, probably residues of the extraction process.

The reducing power and radical scavenger activity were resumed in Table 1. Regarding the flours samples, *A. foliacea* showed significant differences respect ton *P. clarkii*. Flours of two species of *P. clarkii*, as expected, showed comparable reducing power. ABTS, DPPH and FRAP radical scavenger activity assays were conducted on astaxanthin and chitosan. Regarding astaxanthin significant differences were observed only between *P. clarkii* and *A. foliacea* for FRAP and DPPH activities. Regarding chitosan no significant differences were observed in FRAP and DPPH activity comparing the species between each other.

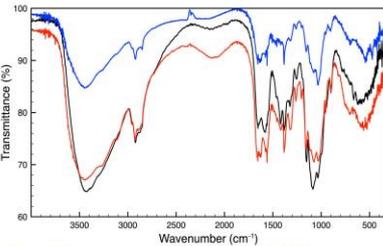


Figure 4 Chitosans samples evaluation using a Jasco FT/IR 420 spectrometer.

Conclusions

The flours and astaxanthin showed very important antioxidant potentiality in particular for *A. foliacea*. This result is very important if we consider the importance of these species in the human food context and the significant waste production they cause. The costs for the production of the flours, astaxanthin and chitosan would offset the costs for the disposal helping to produce potential functional foods. Further studies will be necessary. Despite this, these species have shown considerable potential for applications in various sectors, i.e. in cosmetic, nutraceutical and medical application.

Table 1 Reducing Capacity and Radical Scavenger Activity of flours, astaxanthin and chitosan obtained from *A. foliacea* and *P. clarkii* exoskeleton.

Flours	TPC Mg GAE/g	FRAP Mg AAE/g	DPPH μmol TE/g	ABTS* μmol TE/g
<i>P. clarkii</i> (Gorgi tondi)	1.62±0.02 ^a	1.10±0.02 ^a	4.32±0.06 ^a	6.77±0.23 ^a
<i>P. clarkii</i> (Caccamo)	1.9±0.04 ^b	1.21±0.03 ^a	4.93±0.07 ^a	6.89±0.14 ^a
<i>A. foliacea</i>	5.04±0.12 ^c	2.47±0.12 ^b	9.25±0.11 ^b	14.31±0.43 ^b
Astaxanthin				
<i>P. clarkii</i> (Gorgi tondi)		4.31±0.11 ^a	8.43±0.16 ^a	9.40±0.23 ^a
<i>P. clarkii</i> (Caccamo)		4.27±0.24 ^a	7.91±0.19 ^a	9.76±0.14 ^a
<i>A. foliacea</i>		4.95±0.12 ^b	9.37±0.11 ^b	10.12±0.26 ^a
Chitosan				
<i>P. clarkii</i> (Gorgi tondi)		2.7±0.06 ^a	2.11±0.06 ^a	
<i>P. clarkii</i> (Caccamo)		3.2±0.09 ^a	2.22±0.07 ^a	
<i>A. foliacea</i>		3.10±0.07 ^a	2.16±0.11 ^a	

* TPC, total phenolic content; ^aFRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power; ^aDPPH, 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ^aABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); ^aGAE, Gallic Acid Equivalent; ^aAAE, Acid Ascorbic Equivalent; ^aTE, Trolox Equivalent. Values are the mean ± SD of three determinations carried in duplicate (ANOVA one way associated with Tukey's test). Values in the same column with the same letter are not significantly different for *p* < 0.05.

Mauro, M., Pinto, P., Settanni, L., Puccio, V., Vazzana, M., Hornsby, B.L., Fabbriozzi, A., Di Stefano, V., Barone, G., Arizza, V. Chitosan Film Functionalized with Grape Seed Oil—Preliminary Evaluation of Antimicrobial Activity. Sustainability 2022, 14, 5410

Punginelli, D., Catania, V., Vazzana, M., Mauro, M., Spinello, A., Barone, G., Barberi, G., Fiorica, C., Arizza, V., Schillaci, D. (2022). A Novel Peptide with Antifungal Activity from Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*. Antibiotics, 11(12), 1-19

Souty-Grosset, C., Anastasio, P.M., Aquiloni, L., Banha, F., Choquer, J., Chucholl, C., Tricarico, E. (2016) The red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in Europe: Impacts on aquatic ecosystems and human well-being. Limnologia, 58, 78-93

Allegato 3

BLUE SEA LAND

International Blue Economy Expo



TRANSIZIONI 18 - 22 OTTOBRE 2023 MAZARA DEL VALLO
ponte verso un mare che cambia



**9:00 - 11:00 | Stand Dipartimento Regionale della Pesca mediterranea
Convegno
CENSIMENTO, CARATTERIZZAZIONE, CONTROLLO E
VALORIZZAZIONE DEL GAMBERO ROSSO DELLA LUISIANA
(PROCAMBARUS CLARKII) IN SICILIA**

Saluti:

- **Alberto PULIZZI** - Dirigente Generale del Dipartimento della Pesca Mediterranea della Regione Siciliana

Modera:

- **Federico MARRONE** - Università degli Studi di Palermo

Interventi:

- **Federico MARRONE** - Università degli Studi di Palermo: I crostacei decapodi e le invasioni biologiche nelle acque interne
- **Francesco Paolo FARAONE** - Università degli Studi di Palermo: Aggiornamento delle conoscenze sulla distribuzione di *Procambarus clarkii* in Sicilia
- **Luca VECCHIONI** - Università degli Studi di Palermo: DNA: un filtro di biodiversità! Usi e prospettive legate ai decapodi dulciacquicoli siciliani
- **Francesco LONGO**: *Procambarus clarkii* come nuova risorsa di molecole bioattive: chitosano e astaxantina
- **Claudio GARGANO** - Università degli Studi di Palermo: *Cherax destructor* (Clark, 1836) e *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868): parametri biochimici e potenzialità alimentari
- **Clarissa DE VITA** - Università degli Studi di Palermo: *Cherax destructor*: emissione acustica e sensibilità all'impatto antropico.

Materiali supplementari del WP7

Fare riferimento al file supplementare allegato alla presente relazione.