UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA

E MEDICINA SPERIMENTALE

CURRICULUM IN SCIENZE BIOLOGICHE ED AMBIENTALI

XXXI CICLO

SSD BIO/07

Acquicoltura sostenibile: prove di IMTA con *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, L.M. Irvine & Farnham

Candidato:

DOTT. GIOELE CAPILLO

Relatore:

Prof.ssa NUNZIACARLA SPANO'

Correlatori:

Prof. ANTONIO MANGANARO

DOTT.SSA MARILENA SANFILIPPO

Coordinatore**: Chiar.ma Prof.ssa MARIA ASSUNTA LO GULLO**

ANNO ACCADEMICO 2017-2018

Al Prof. Antonio Manganaro, Mentore di Vita e di Scienza

A Nancy Spanò, Forza e Determinazione

A Marilena Sanfilippo, Amica e Maestra di Metodo

A Giovanni Maio, Prezioso Faro nella Notte

Sommario

Prefazione **5**

Introduzione **7**

Acquicoltura, un settore in continua crescita 7

Sistemi di produzione 11

Impatti ambientali dell'acquicoltura 13

Utilizzo delle risorse selvatiche per la produzione di specie allevate *15*

Scarico dei reflui *17*

Utilizzo di risorse naturali *19*

Contaminazione chimica *21*

Conservazione e perdita della biodiversità *22*

Insorgenza di patologie *23*

Inquadramento e scopo dello studio 24

Descrizione generale dell'IMTA 27

OR1, Identificazione organismo **29**

Caratteristiche biologiche di *Gracilaria gracilis* 30

Popolazione naturale di *Gracilaria gracilis* nella RNO di Capo Peloro 32

Descrizione zona di campionamento *32*

Evidenze della presenza di G. gracilis nel Pantano di Ganzirri *37*

Metodi di coltura di *Gracilaria gracilis* 38

Coltivazione su fondale *38*

Coltivazione tramite il metodo dei telai "Frame" *39*

Coltivazione tramite il metodo dei telai galleggianti "Floating raft method" *39*

Agar e altri prodotti da *Gracilaria gracilis* 41

Gracilaria gracilis, "Multi Product Source" *41*

Agar dalla Gracilaria gracilis del pantano di Ganzirri *42*

Agar: caratteristiche e applicazioni *45*

OR2, metodi di coltura in ambiente naturale **49**

Introduzione 50

Materiali e metodi 52

Area di studio, punti di raccolta e d'impianto *52*

Raccolta alghe *52*

Metodi di coltura *53*

Disegno sperimentale *55*

Analisi parametri ambientali *55*

Tassi di crescita *55*
Analisi statistiche *56*
Risultati 58
Metodo dei telai *58*
Metodo delle reste *59*
Discussione 61
Conclusioni 64

OR3, determinazione abbattimento "nutrienti" 65

Introduzione 66
Materiali e metodi 68
Esperimento in Mesocosmo *68*
Esperimento in impianto *70*
Tassi di crescita *71*
Analisi statistiche *71*
Risultati 72
Esperimento in mesocosmo *72*
Esperimento in impianto *74*
Discussione 77
Conclusioni 80

OR4, applicazioni biotecnologiche 81

A.4.1, Effetti di *G. gracilis* nell'alimentazione di zebrafish (*Danio rerio*) 82

Introduzione 82
Materiali e metodi 83
Gestione dei pesci e dieta sperimentale *83*
Raccolta e trattamento di G. gracilis *84*
Preparazione della dieta sperimentale *84*
Studio dell'espressione genica *85*
Valutazione dei parametri dell'immunità mucosale *86*
Performance di crescita *87*
Analisi statistiche *87*
Risultati 88
Discussione 91
Conclusioni 94

A.4.2, Effetti antimicrobici di estratti di *G. gracilis* su patogeni umani e in acquicoltura 95

Introduzione 95

Materiali e metodi 97
Prelievo della G. gracilis *97*
Trattamento dell'alga *97*
Estrazione Soxhlet *97*
Ceppi batterici trattati *98*
Valutazione dell'attività antimicrobica *99*
Risultati 100
Discussione 101
Conclusioni 103

Considerazioni finali 104

Visibilità del lavoro 106

Bibliografia 107

Prefazione

"*L'acquicoltura è l'allevamento di organismi acquatici (pesci, molluschi, crostacei, e organismi vegetali acquatici). Questo implica forme di intervento umano, attraverso l'allevamento, nei processi di accrescimento, mediante i sistemi di semina e controllo, alimentazione, protezione o controllo dai predatori, ecc. L'allevamento implica inoltre la proprietà, in forma associata o singola, dello stock in allevamento. A fini statistici, viene considerata come acquicoltura la produzione di tutti gli organismi acquatici allevati da soggetti che ne hanno detenuto la proprietà, in forma singola o associata, durante il periodo di accrescimento, mentre gli organismi acquatici che costituiscono una risorsa di comune proprietà, accessibile con o senza uno specifico permesso, costituiscono il prodotto della pesca".* [1]

In altre parole, con il termine "acquicoltura" si intende l'insieme delle tecniche volte alla produzione di organismi acquatici, attraverso l'intervento dell'uomo su una parte o sull'intero ciclo biologico degli stessi.

Sotto il profilo giuridico, l'acquicoltura si concretizza in una attività di allevamento o coltivazione, differenziandosi dalla semplice "cattura" o "raccolta", e pertanto è riconducibile all'agricoltura, indifferentemente se viene realizzata in acque interne (dolci o salmastre) o in acque marine (sia in impianti a terra che in mare aperto).

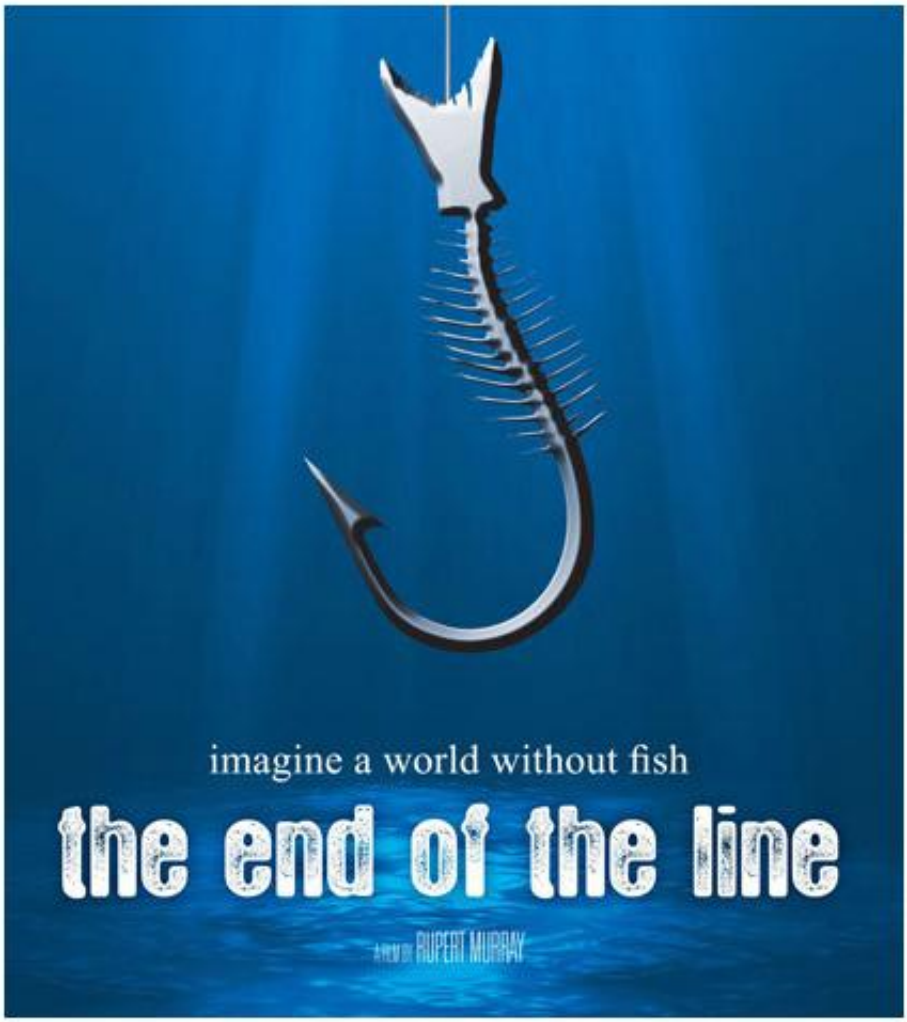
L'acquicoltura, oltre che in termini di funzionamento, si contrappone nettamente alla pesca anche per quanto concerne i numeri di produzione dei due settori.

La produzione di prodotti ittici da parte del settore pesca si attesta su valori statici fin dagli anni '80; questo ha prodotto una crescita logaritmica della produzione ittica di derivazione acquicolturale.

Per meglio comprendere i numeri di quest'ascesa della produzione ittica destinata al consumo umano basta tenere in considerazione che, se nel 1974 i prodotti ittici allevati in impianti di acquicoltura si attestavano al 7%, già nel 1994 avevano subìto una crescita fino al 26%. Questo trend di crescita si è mantenuto costante nel corso degli anni successivi, fino al raggiungimento nel 2004 del 39% e a oggi la produzione ittica dell'acquicoltura ha raggiunto il 50% del consumo umano [1]. Le stime prevedono che entro il 2030 la richiesta di prodotti ittici aumenterà di 27

milioni di tonnellate e, in una situazione di continuo depauperamento degli stock ittici e di sempre crescente "avvelenamento" del mare e delle acque interne, è facilmente immaginabile che la crescita del settore Acquicoltura sarà inarrestabile.

Se a questo si aggiungono la crescente diversità di specie prodotte e gli elevati standard produttivi raggiunti negli ultimi anni nelle produzioni acquicolturali, con prodotti con caratteristiche di innegabile valore nutrizionale e sicurezza alimentare derivanti dalle condizioni controllate di allevamento, si delinea un prossimo futuro in cui la pesca subirà drastiche perdite e i prodotti ittici destinati all'alimentazione umana deriveranno quasi esclusivamente dall'acquicoltura.



Introduzione

Acquicoltura, un settore in continua crescita

I prodotti di origine acquatica rappresentano una fondamentale fonte di alimentazione per il sostentamento della specie umana. Questi forniscono proteine, micronutrienti essenziali quali vitamine e minerali e acidi grassi polinsaturi.

Tali composti hanno un elevato impatto nutrizionale positivo sulla salute umana.

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato gli effetti benefici di questi alimenti su malattie coronariche cardiache, ictus, salute mentale, ipertensione, alcuni tumori, artrite reumatoide e altre malattie infiammatorie (Fig. 1)[2]. Inoltre, i prodotti ittici ricoprono un importante ruolo anche per il loro valore economico-commerciale [3].

Specie di elevato interesse commerciale comprendono ma non si limitano a pesci ossei, molluschi, crostacei e alghe.

Figura 1; Effetti dell'assunzione di alimenti di origine acquatica.

Come già evidenziato in prefazione, la richiesta di prodotti ittici da parte dei consumatori ha subìto un'impennata negli ultimi decenni tale che la fonte di approvvigionamento tradizionale di prodotti ittici (pesca) non è riuscita a soddisfare; così l'acquicoltura ha reagito alla crescente richiesta aumentando (Fig. 2), intensificando e diversificando il *range* delle produzioni, espandendosi in nuove aree con sempre più specie allevate (Fig. 3).

I massimi dati registrati in termini di produzione e di vendita di specie ittiche negli ultimi anni sono proprio derivanti dagli allevamenti in condizioni controllate [4].

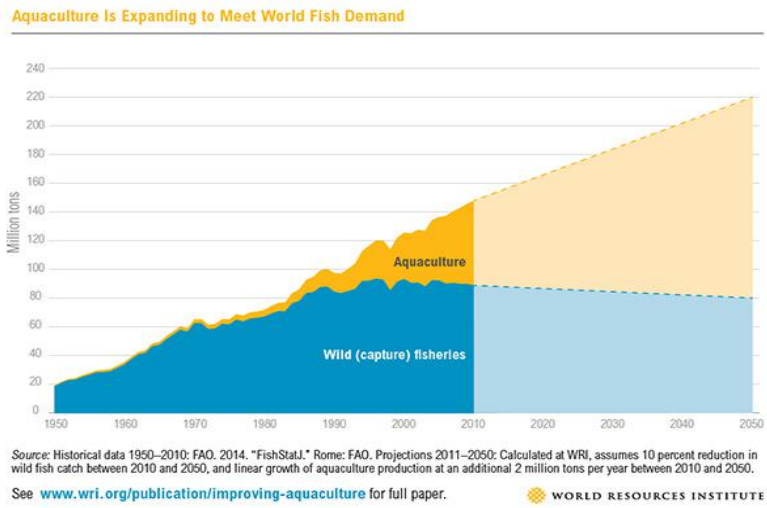


Figura 2; Produzione odierna e stime produttive per pesca e acquicoltura.

Figura 3; Diversificazione dell'offerta in acquicoltura.

Nel 2012 i prodotti della pesca e dell'acquicoltura hanno raggiunto circa 158 milioni di tonnellate, delle quali oltre l'86% è stato destinato al consumo umano. Nonostante ciò, stime del 2011 hanno definito gli stock ittici come segue:

- 61.3% completamente sfruttati
- 28.8% sovra-sfruttati
- 9.9% sotto-sfruttati [5] (Fig. 4).

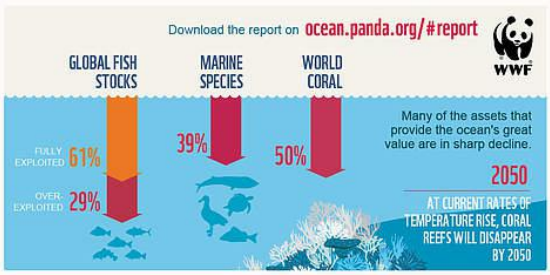
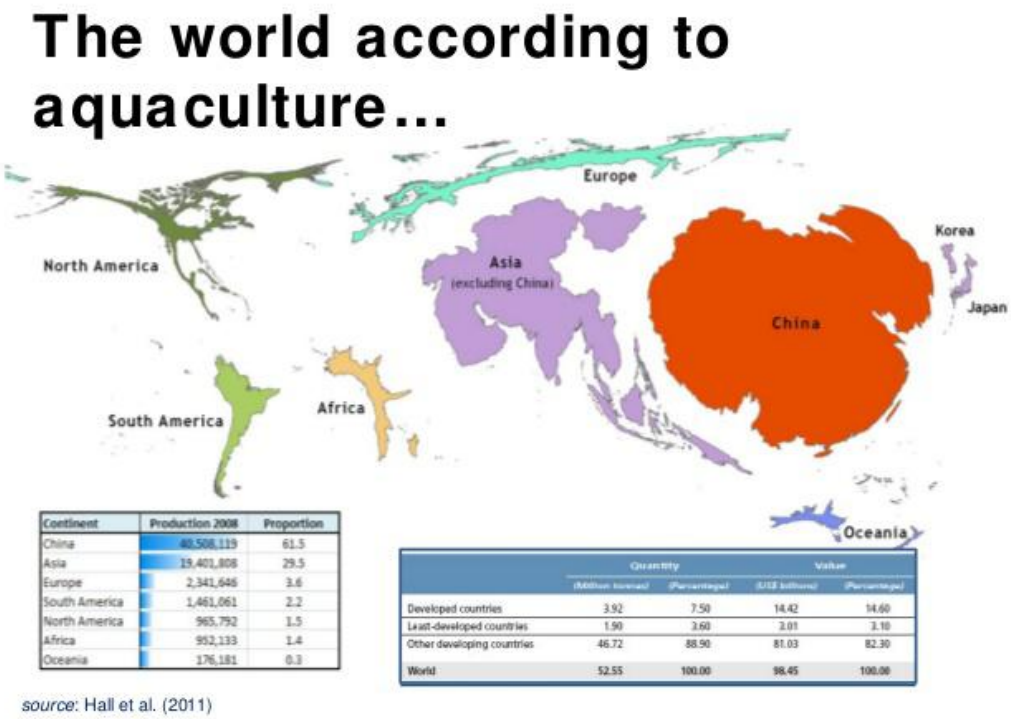


Figura 4; Stato degli stock ittici e situazione dei mari

L'altra faccia della medaglia si mostra come un'inarrestabile crescita del settore acquicolturale. Questo settore, infatti, ha fatto registrare una crescita annua media del 6.3% provvedendo negli ultimi anni a più della metà della richiesta dei prodotti ittici a livello globale. La crescente produzione registrata per l'acquicoltura è quasi completamente destinata al consumo umano, e fin dalla metà degli anni '90 ha rappresentato la forza trainante nella produzione di pesce a livello globale [4].

Il panorama acquicolturale mondiale è principalmente dominato dalla regione Pacifico-Asiatica che provvede per l'89% in termini di volume e per il 79% in termini di valore commerciale al pesce allevato, di cui la sola Cina ne produce rispettivamente il 60% e il 51%. Gli altri principali produttori Asiatici sono rappresentati da India, Vietnam, Indonesia, Bangladesh, Tailandia, Myanmar, Filippine e Giappone (Fig. 5).



Coetlinent	Production 2008	Proportion
China	40,508,119	61.5
Asia	19,401,808	29.5
Europe	2,341,646	3.6
South America	1,461,061	2.2
North America	965,792	1.5
Africa	952,133	1.4
Oceania	176,181	0.3

	Quantity		Value	
	(Million tonnes)	(Percentage)	(US$ billions)	(Percentage)
Developed countries	3.92	7.50	14.42	14.60
Least-developed countries	1.90	3.60	3.01	3.10
Other developing countries	46.72	88.90	81.03	82.30
World	52.55	100.00	98.45	100.00

Figura 5; Il mondo dell'acquicoltura.

In Europa la crescita media del settore acquicolturale si è attestata a un timido 1.2%, con una produzione del solo 4.5% della totalità globale [6]. Il 40% della produzione europea è attribuibile alla Norvegia, seguita da Spagna, Francia, Italia e Regno Unito [7]. Le strategie politiche comunitarie hanno definito il loro scopo nell'aumento della produzione, nella diversificazione, ma anche nell'aumento della qualità del prodotto, in modo da rendere più elevata la competitività del settore acquicolturale europeo [8]. Inoltre, l'Unione Europea, sicuramente più attenta alle tematiche ambientali rispetto alle controparti asiatiche, ha definito una serie di azioni volte a promuovere la sostenibilità ambientale, sociale ed economica dell'acquicoltura.

Sistemi di produzione

I sistemi acquicolturali nazionali e internazionali, in quanto a caratteristiche tecniche e strutturali degli impianti, si distinguono in tre tipologie: estensivo, semi-intensivo e intensivo; quest'ultimo a sua volta si divide in impianti in-shore (in vasche a terra) e impianti off-shore (in gabbie a mare).

Gli impianti estensivi (Fig. 6) sono quelli che sfruttano determinate caratteristiche morfologiche di zone che consentono di realizzare un allevamento senza apportare modifiche strutturali all'ambiente nè di carattere ambientale tantomeno di carattere ecologico. In questo tipo di acquicoltura, infatti, la dieta degli organismi allevati si basa esclusivamente sulle potenzialità trofiche dell'ambiente in cui essi sono allevati.

Figura 6; Esempio di acquicoltura estensiva.

Le attività umane nell'acquicoltura estensiva sono limitate alla semina degli avannotti e al controllo dei predatori. Tali allevamenti persistono spesso in valli, lagune o stagni costieri. Nonostante il basso contributo umano e i costi contenuti, questo sistema può fornire discreti risultati in termini di produzione ittica con impatto sull'ambiente basso, o quasi nullo [9].

Gli impianti semintensivi (Fig. 7) localizzati anch'essi in zone naturali relativamente chiuse, prevedono alcuni interventi dell'uomo durante l'accrescimento delle specie allevate. L'alimentazione non deriva più esclusivamente dall'ambiente ma è integrata, in misura relativa, da dieta artificiale (pellet commerciale o altre fonti di cibo).

Figura 7; Esempio di impianto semi-intensivo. A destra è possibile notare l'agitatore per l'ossigenazione delle acque.

In taluni casi le acque di allevamento sono ossigenate e i reflui in uscita trattati [1].

Gli impianti intensivi, a differenza di quelli in precedenza descritti, si basano sull'elevata concentrazione della biomassa in ambienti ristretti e sul controllo totale del ciclo vitale degli organismi allevati, della loro alimentazione, delle acque di allevamento e di tutti gli aspetti che riguardano la produzione. Questi possono essere realizzati in vasche a terra (in-shore) e/o in gabbie a mare (off-shore) (Fig. 8).

Figura 8; Acquicoltura intensiva. A: gabbie in mare, B: vasche a terra in cemento, C: vasche a terra in vetroresina.

Quest'ultimo sistema descritto è il più redditizio e diffuso nel panorama nazionale e internazionale. Ovviamente, però, un sistema simile comporta tutta una serie di ricadute sui diversi aspetti intrinseci di un impianto quali l'ittiopatologia, la mangimistica, la genetica, gli aspetti gestionali, economici, ecc. Il tipo di acquicoltura appena descritto s'inquadra in una prospettiva strettamente industriale e imprenditoriale, tanto da attribuirgli il nome di Acquicoltura industriale [10].

Impatti ambientali dell'acquicoltura

L'acquicoltura industriale, come ogni altra attività produttiva umana, può generare impatti ambientali più o meno marcati. Questi sono ascrivibili ai processi industriali e allo sfruttamento delle risorse. Alcuni effetti possono essere positivi ma altri, soprattutto nel medio e lungo termine, non rispondono ai requisiti sempre più pressanti di sostenibilità ambientale delle produzioni [11]. Si rende quindi chiaramente necessaria la creazione di misure di conservazione da applicare ai sistemi acquicolturali in grado di promuovere l'uso sostenibile delle risorse e di ridurre al minimo l'impatto degli impianti.

La "questione ambientale" dell'acquicoltura è stata già (negli anni '90) discussa e regolamentata dall'Unione Europea sotto forma di "Politica Comune della Pesca (CFP, Common Fisheries Policy)" [12] che mira a garantire che la pesca e l'acquicoltura siano sostenibili dal punto di vista ecologico, economico e sociale, e che rappresentino una fonte di alimenti sani per i cittadini dell'UE. L'attenzione di questa direttiva è principalmente focalizzata su attività acquicolturali in zone costiere. Inoltre, durante gli ultimi trenta anni, l'UE ha compiuto grandi sforzi per quanto riguarda la gestione degli impatti ambientali dell'acquicoltura marina, attraverso l'attuazione di numerose direttive come la EQOs (Environmental Quality Objectives) e la EQSs (Environmental Quality Standards) [13].

Ciononostante, ulteriori nuove norme si rendono necessarie per garantire la totale sostenibilità ambientale dell'acquicoltura.

In termini pratici i principali impatti dell'acquicoltura (Fig. 9) si possono riassumere in:

1.3.1 Utilizzo delle risorse selvatiche per la produzione di specie allevate

1.3.2 Scarico degli effluenti

1.3.3 Utilizzo di risorse naturali

1.3.4 Contaminazione chimica

1.3.5 Conservazione e perdita della biodiversità

1.3.6 Insorgenza di patologie

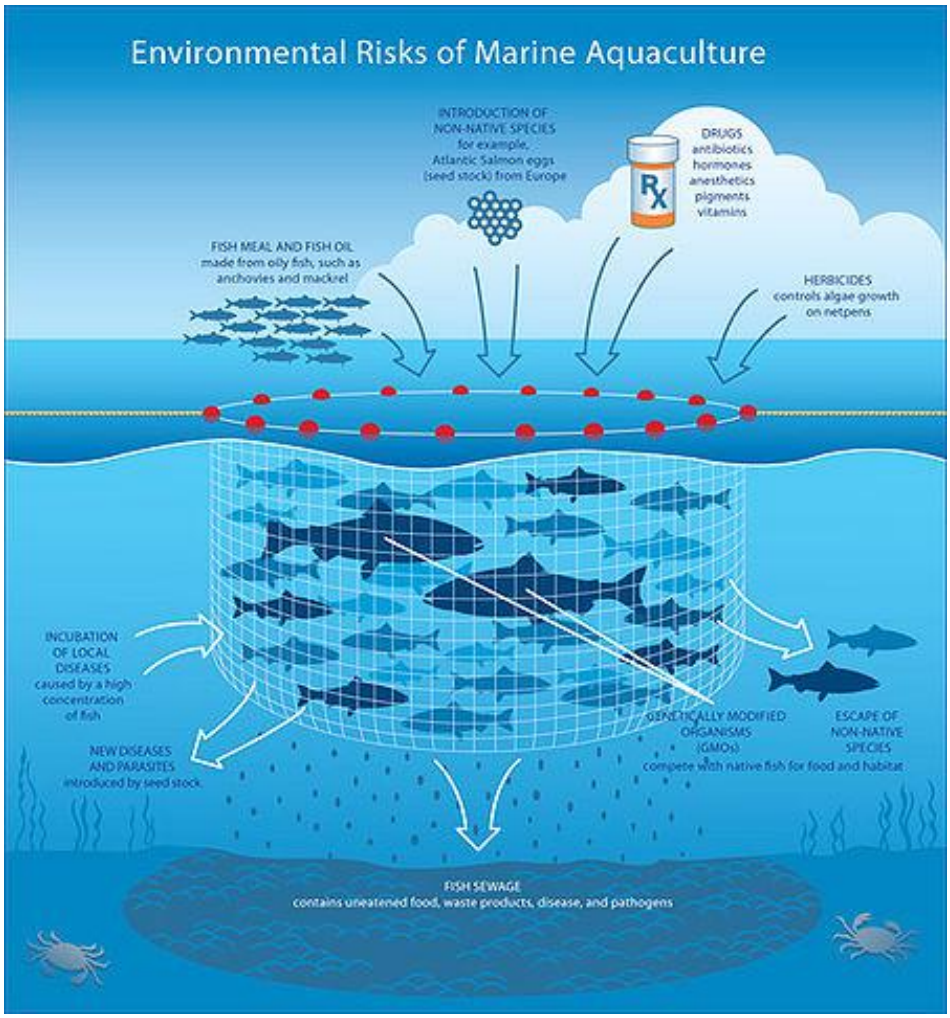


Figura 9; Schema riassuntivo degli impatti dell'acquicoltura.

Utilizzo delle risorse selvatiche per la produzione di specie allevate

L'utilizzo delle risorse selvatiche per l'allevamento è uno dei più discussi problemi inerenti la sostenibilità dell'acquicoltura.

L'allevamento di specie ittiche comporta, infatti, lo sfruttamento degli stock selvatici da utilizzare direttamente come alimento o per la produzione di mangimi (Fig. 10) [14].

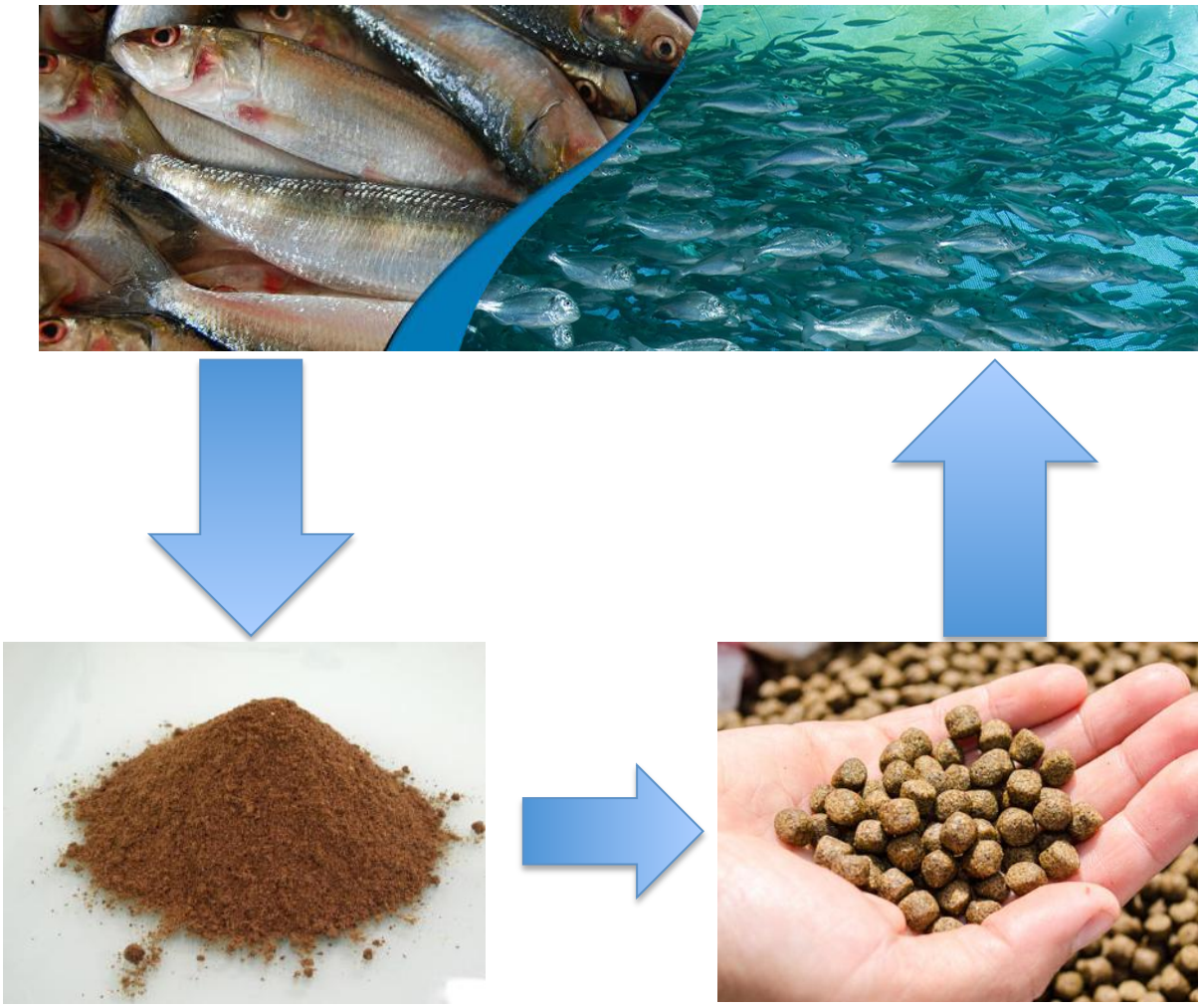


Figura 10; Mangimi derivanti da farine di pesce.

La crescita imponente dell'acquicoltura è ritenuta da alcuni autori come una soluzione all'*overfishing* di alcune specie, fornisce inoltre un consistente contributo alla sicurezza alimentare, e da altri come un rischio per il sovra-sfruttamento degli stock di piccoli pesci pelagici, in quanto l'allevamento di specie ittiche dipende in buona percentuale da questi ultimi [15]. A supporto di quest'ultima ipotesi, alcuni autori affermano che, se la pressione sugli stock ittici utilizzati per i mangimi non sarà ridotta, l'acquicoltura potrebbe, a lungo termine, subire una riduzione di

produzione complessiva dovuta proprio al sovra-sfruttamento delle risorse ittiche [16]. Purtroppo, però, un'alimentazione a base di farine e oli di pesce, oltre a fornire alti livelli di proteine, è un'eccellente fonte di acidi grassi essenziali (ω-3) indispensabili per lo stato di salute del pesce allevato. Queste caratteristiche rendono aringhe, sardine e alacce, ingredienti chiave nella formulazione di mangimi, che siano essi destinati all'acquicoltura o alla zootecnia classica (suini e pollame) [4,17]. Gli allevamenti intensivi utilizzano mangimi commerciali con diverse percentuali di farine di pesce in funzione delle necessità nutrizionali della specie allevata, dal salmone con il 100% di mangime, alla carpa con "solo" il 38% [18].

La letteratura scientifica ha proposto numerose possibili alternative riguardo questa problematica; di queste però è necessario stabilirne l'applicabilità in allevamento e la sostenibilità economica [18].

Promettenti risultati sono stati ottenuti dal trattamento degli scarti della pesca professionale; questi, infatti, sono stati inclusi nella produzione di farine di pesci attestandosi (2010) a circa il 36% della produzione totale [4].

Fra le alternative emergenti si possono considerare proteine e oli vegetali, proteine algali, oli prodotti con tecnologie di fermentazione industriale, insetti, e altri [17,19–21].

Nonostante i numerosi sforzi da parte della ricerca scientifica a tal riguardo, si è però ancora lontani dall'identificazione di una risorsa completamente sostenibile per la formulazione di un mangime che possa sostituire validamente la composizione a base di farine e oli di pesce.

Scarico dei reflui

I reflui di determinati impianti di acquicoltura sono un'altra fonte di preoccupazione che mina alle basi la sostenibilità degli allevamenti ittici.

Gli scarichi di un impianto di acquicoltura possono essere classificati in: continui (derivanti dalla produzione) e periodici (derivanti dalle attività di allevamento: sostanze chimiche per la pulizia, farmaci veterinari, vernici per il trattamento delle vasche/gabbie, ecc.) [13].

L'allevamento di specie ittiche, ovviamente, causa il rilascio di scarti metabolici e non, sotto forma di feci, pseudo-feci, cibo mal digerito o non consumato; questi sono i principali fattori responsabili dell'aumento di carico organico e inorganico (nutrienti) nelle vicinanze degli impianti di acquicoltura [14].

L'arricchimento organico e inorganico comporta il deterioramento dei corpi idrici in cui gli scarichi fluiscono [22]. Gli input in azoto e fosforo in un impianto di acquicoltura marina vengono rilasciati nei corpi idrici circostanti con percentuali fra il 52 e il 95% per l'azoto e l'85% per il fosforo, a causa di cibo non ingerito, escrezioni dei pesci e produzione di feci [23]. Gli effluenti degli impianti di acquicoltura (specialmente se di crostacei) sono carichi in solidi sospesi, nutrienti come ammoniaca, nitriti, nitrati e fosfati, carbonio organico disciolto, lipidi, ecc [24]. Questi costituenti sono considerati i più importanti prodotti di scarto dell'acquicoltura poiché influenzano negativamente la qualità degli ambienti in cui vengono riversati [11].

Il destino di tali sostanze rilasciate nell'ambiente dipende da diversi fattori intrinseci dell'area di rilascio, quali: le caratteristiche idrologiche, la topografia del fondale e la geografia dell'area. I possibili impatti di tali versamenti dipendono principalmente dal tasso di assorbimento dei nutrienti da parte dell'ecosistema [13].

I mangimi utilizzati, con le loro alte concentrazioni di proteine e grassi, creano scarti biologici dei pesci allevati in cui l'azoto viene espulso come disciolto (principalmente ione ammonio) e il fosforo sotto forma di particolato [25]. L'ammonio appena immesso nell'ambiente viene ossidato da batteri in nitriti e successivamente in nitrati. Inoltre, alte concentrazioni di ammonio

competono, per l'ossigeno da destinare alla nitrificazione, con gli organismi acquatici e, nel caso in cui la necessità di ossigeno sia superiore alla disponibilità di questo, si rischiano fenomeni di anossia delle acque e di conseguenza dei sedimenti [26]. Questo, ovviamente può portare a modifiche nei processi chimici e biologici dei sedimenti che influiscono direttamente sulle biocenosi bentoniche.

Ancora, alte concentrazioni di azoto e fosforo possono portare a eutrofizzazione, che sono considerati i due principali processi innescati da reflui di impianti di acquicoltura, sia a terra che in mare [26]. Tali processi portano all'instaurarsi di eventi che spesso sfociano in *bloom* fitoplanctonici, comportando drastiche riduzioni dell'ossigeno disciolto e rischio per la vitalità degli organismi presenti nell'area [11,27,28].

Altre modificazioni degli ambienti in cui persistono importanti scarichi d'impianti di allevamento ittico comprendono cambi strutturali e funzionali degli ecosistemi acquatici; eventi simili seguono un'evoluzione che inizialmente impatta su fitoplancton e fitobenthos e in seguito si propaga lungo la rete trofica della zona. I danni alla struttura ecosistemica che ne derivano includono la perdita di biodiversità e lo stravolgimento degli equilibri fisiologici degli organismi che si rifletteranno in variazioni di abbondanza delle varie specie nelle popolazioni [29].

Inoltre, l'arricchimento organico dei sedimenti può comportare l'evoluzione dell'ecosistema, con una drastica diminuzione della biodiversità [30].

Utilizzo di risorse naturali

Risorse naturali come acqua e habitat subiscono gli effetti della presenza degli impianti di acquicoltura.

Nelle acque di scarico, anche in quelle di allevamento, si assiste a una soprassaturazione di "nutrienti" che devono essere logicamente eliminati, in modo da non impattare negativamente sulla salute degli organismi allevati. La soluzione a tale problema è rappresentata da un continuo ricambio dell'acqua di allevamento.

Questo sistema presenta però dei limiti, principalmente dettati dalla regolamentazione "ambientale" del rilascio di acque ricche in nutrienti nell'ambiente circostante per i sopracitati problemi, e il fatto che l'ampio consumo di acqua possa portare sicuramente notevoli spese [31]. È stato dimostrato che, ad esempio, l'acquicoltura intensiva in acque dolci consuma più acqua per unità di area dell'agricoltura [32].

L'unica soluzione reale a tale problema è rappresentata dalla riduzione, ove possibile, dei reflui, che non solo comporta un ridotto volume di acqua utilizzata in ingresso ma anche un risparmio economico per l'azienda.

Un'altra risorsa naturale impattata dall'acquicoltura è l'habitat [33].

Gli allevamenti a terra richiedono superfici da sfruttare per l'impianto delle strutture, mentre gli allevamenti in mare occupano volumi di colonna d'acqua e superfici dei fondi marini. Nel caso di questi ultimi, la maggior parte degli impianti di piscicoltura e molluschicoltura del Mediterraneo sono stati ben posizionati e hanno influenzato in maniera relativa gli habitat in cui persistono [34].

Nell'ambito di tutela degli ambienti acquatici la Comunità Europea nel 2000 ha varato la "Water Framework Directive" [35] che con diversi strumenti tende a proteggere tutte le aree costiere e le acque interne dalle odierne pressioni ambientali. L'obiettivo finale di tale direttiva è raggiungere lo stato ecologico "buono" per questi ambienti nell'immediato futuro [36].

Pertanto, si rendono necessari interventi che possano mitigare le seguenti pressioni ambientali identificate secondo l'IMPRESS [37]:

a. Inquinamento da industrie e agricoltura e scarichi di acquicoltura
b. Alterazione dei regimi idrologici, compreso il prelievo di acqua
c. Cambiamenti nella morfologia, compresi bonifica e infrastrutture
d. Sfruttamento delle risorse biotiche e cambiamenti nella biodiversità.

Contaminazione chimica

Oltre al carico di nutrienti già discusso, un altro impatto ambientale dell'acquicoltura è dato dallo sversamento di sostanze chimiche nell'ambiente (come già accennato), quali pesticidi, farmaci, vernici *antifouling*, anestetici e disinfettanti [38].

In particolare, l'uso degli antibiotici può agire sulle specie che convivono nello stesso habitat e, quindi, causare effetti negativi [39]. L'uso di farmaci per la profilassi e la loro persistenza nell'ambiente rappresentano un ulteriore problema [13].

In acquicoltura, come in ogni altro settore della produzione di cibo, il trattamento antiparassitario e immunizzante è necessario; negli ultimi anni lo sviluppo delle conoscenze e delle pratiche rispetto la gestione degli stock ittici in allevamento, ha permesso una riduzione considerevole dell'utilizzo di numerose sostanze chimiche [38].

Conservazione e perdita della biodiversità

Un altro problema da considerare nell'acquicoltura industriale è il rischio di introduzione di specie alloctone, potenzialmente invasive, che rischiano di stravolgere gli equilibri ecosistemici di una data area, entrando in competizione o addirittura soppiantando le specie autoctone e minando alla base la conservazione degli habitat naturali e la loro intrinseca biodiversità.

Le specie allevate in acquicoltura, infatti, sono specie che rispondono a determinate caratteristiche di ampia distribuzione, alta resistenza alle variazioni dei parametri ambientali e ai patogeni, alta variabilità genetica, ciclo vitale breve, crescita rapida e precoce maturità sessuale. Va da sé che specie con le appena descritte caratteristiche rappresentano specie potenzialmente invasive per qualsiasi ambiente [40]. Rilasci, accidentali e non, di esemplari in natura possono rappresentare, oltre che un rischio per la biodiversità, alti rischi di trasmissione dei patogeni. Gli impianti che rappresentano i maggiori rischi in tale ottica sono quelli in mare, specialmente quelli a gabbie e/o long-line. Ad esempio fughe di pesci dalle gabbie possono avvenire giornalmente in seguito a operazioni da parte degli addetti, in seguito a incidenti, condizioni meteo avverse, danni da predatori ecc. Gli impatti di specie alloctone immesse in natura possono essere di tipo biotico o abiotico e comprendono: competizione, predazione, danni all'habitat, alterazioni della qualità delle acque, ibridizzazione e immissione di parassiti e/o patologie [34,41].

Fra gli esempi più eclatanti di organismi importati tramite l'acquicoltura, due fra i più noti sono rappresentati dal mollusco bivalve *Ruditapes philippinarum* (che ha soppiantato la specie autoctona *Ruditapes decussatus*) originario delle coste pacifiche dell'Asia e ormai diffuso nelle acque di tutta Europa e Nord America con popolazioni ben strutturate e stabili [42], e dal crostaceo decapode *Cherax destructor*, originario dell'Australia che è passato dallo stato vulnerabile secondo la lista dell'IUCN (International Union for the Conservation of the Nature) a specie aliena invasiva pericolosa per le acque interne italiane ed europee [43].

Insorgenza di patologie

Come in ogni altro ambiente, anche nelle acque controllate degli impianti di acquicoltura e negli ambienti acquatici naturali, l'insorgenza di patologie è un processo complesso che comprende le interazioni fra la specie ospite, l'agente patogeno e l'ambiente [44].

Le condizioni di allevamento, intensivo e semi-intensivo, possono favorire l'insorgenza di patologie a causa delle procedure di manipolazione, dell'alta densità degli stock, degli stress elevati, dell'alimentazione intensiva e dei ricambi d'acqua inadeguati. Spesso gli organismi allevati vivono e resistono alla presenza di patogeni nelle acque di allevamento senza contrarre la malattia, ma in caso d'incremento degli stress questo equilibrio viene meno e favorisce la manifestazione patologica delle infezioni [11].

Diverse patologie rappresentano seri rischi per la produzione di un impianto e di conseguenza influiscono sull'espansione economica dell'acquicoltura. Il controllo delle patologie in un allevamento intensivo crea ulteriori costi che incidono sull'economia dell'attività [45].

Un interessante campo che offre soluzioni potenziali è la ricerca di probiotici e prebiotici da utilizzare in aggiunta al mangime commerciale. Queste sostanze stimolando il sistema immunitario degli organismi allevati potrebbero rappresentare il futuro per un'acquicoltura libera da farmaci e antibiotici [46–50].

Inquadramento e scopo dello studio

Tutte le problematiche finora descritte rendono una visione dell'acquicoltura limitata ai suoi aspetti negativi; nonostante questi, la produzione ittica in condizioni controllate, come già evidenziato in precedenza, rappresenta il futuro dell'alimentazione a base di prodotti acquatici.

Quindi, i problemi sopra descritti devono essere affrontati con metodi scientifici/empirici, di modo da arginarli il più possibile, trasformando i problemi in risorse.

L'analisi finora condotta ha evidenziato fra i problemi principali dell'acquicoltura lo sversamento dei reflui con i suoi carichi organici da prodotti di "scarto" dei processi di produzione.

Nonostante l'accettore finale dei reflui di un impianto di acquicoltura sia l'ambiente acquatico, una parte consistente del carico in solidi sospesi è trattenuta in strutture appositamente studiate quali bacini di sedimentazione, canali di scarico o superfici in vicinanza della struttura. Ciononostante, sia le acque di allevamento sia gli habitat costieri adiacenti agli impianti sono teatro di alti tassi di attività biologica degradativa delle sostanze organiche disciolte creando seri rischi all'ecosistema, come in precedenza descritto. A tal riguardo, le pratiche acquicolturali eco-compatibili e con ricadute positive sulla "salute" dell'ecosistema, sono molto incoraggiate dalle politiche comunitarie. Tali pratiche includono, ma non si limitano a, gestione e sistemi di trattamento biologico dei reflui con colture integrate [22].

Questo tipo di approccio a un'acquicoltura sostenibile, noto come IMTA (Integrated Multi-Trophic Acquaculture), si basa anche e soprattutto sulla prospettiva, nel prossimo futuro, di abbattimento del carico in nutrienti nei reflui degli impianti di acquicoltura intensiva. Ci si attende, per i prossimi anni e in accordo con le aspettative della WFD, una riduzione sensibile dei limiti massimi di concentrazione consentiti per l'emissione di sostanze "pericolose" disciolte nei reflui dell'acquicoltura; i limiti si baseranno direttamente sui valori di concentrazioni di tali sostanze negli ambienti di destinazione finale dei reflui [35].

Nella situazione sopra delineata s'inquadra il presente studio con i suoi diversi obiettivi realizzativi (OR) volti a creare un protocollo di trasformazione e sfruttamento dei problemi

dell'acquicoltura in risorse per pratiche acquicolturali ecologicamente ed economicamente sostenibili.

L'impalcatura del progetto svolto nel corso dei tre anni si è basata sui quattro punti di seguito descritti e riassunti in figura 11:

OR1, identificazione organismo

L'obiettivo realizzativo 1 ha previsto l'analisi bibliografica delle conoscenze pregresse sui diversi organismi utilizzabili in acquicoltura multi-trofica integrata e la valutazione di quale potesse rispondere alle necessità di sfruttamento "sostenibile" fondamentali per la scelta. Il risultato dell'analisi svolta ha condotto alla scelta dell'alga rossa *Gracilaria gracilis*.

OR2, metodi di coltura in ambiente naturale

Una volta selezionata la *G. gracilis* come organismo oggetto dello studio si è proceduto, tramite l'OR2, alla valutazione dei diversi metodi di coltura in ambiente naturale al fine di identificare il più efficiente e applicabile di questi in ambiente controllato.

OR3, determinazione abbattimento "nutrienti"

La possibilità di sfruttare la *Gracilaria gracilis* nelle acque di scarico d'impianti di acquicoltura è stata inizialmente valutata in mesocosmo (vasche appositamente allestite in laboratorio) e in seguito *in-situ* (impianto di acquicoltura "Acqua Azzurra spa" Pachino, SR) in vasche appositamente costruite e alimentate da acque di scarico al fine di valutare e la crescita in ambiente controllato e il potenziale di "depurazione" dell'alga.

OR4, applicazioni biotecnologiche

È ben noto l'elevato contenuto in agar della *G. gracilis*, ma poco note sono le altre potenzialità di questa Rodophyta; a tal proposito, nell'obiettivo realizzativo 4 sono state valutate, tramite le due Attività (A.1 e A.2) le potenziali applicazioni dell'alga oggetto dello studio, valutando:

- L'effetto immunostimolante dell'alga complessata in diverse percentuali in un mangime commerciale somministrato a *Danio rerio* (zebrafish).

- Gli effetti antimicrobici di vari estratti di *G. gracilis* contro diversi ceppi batterici, tra cui patogeni umani e ittici.

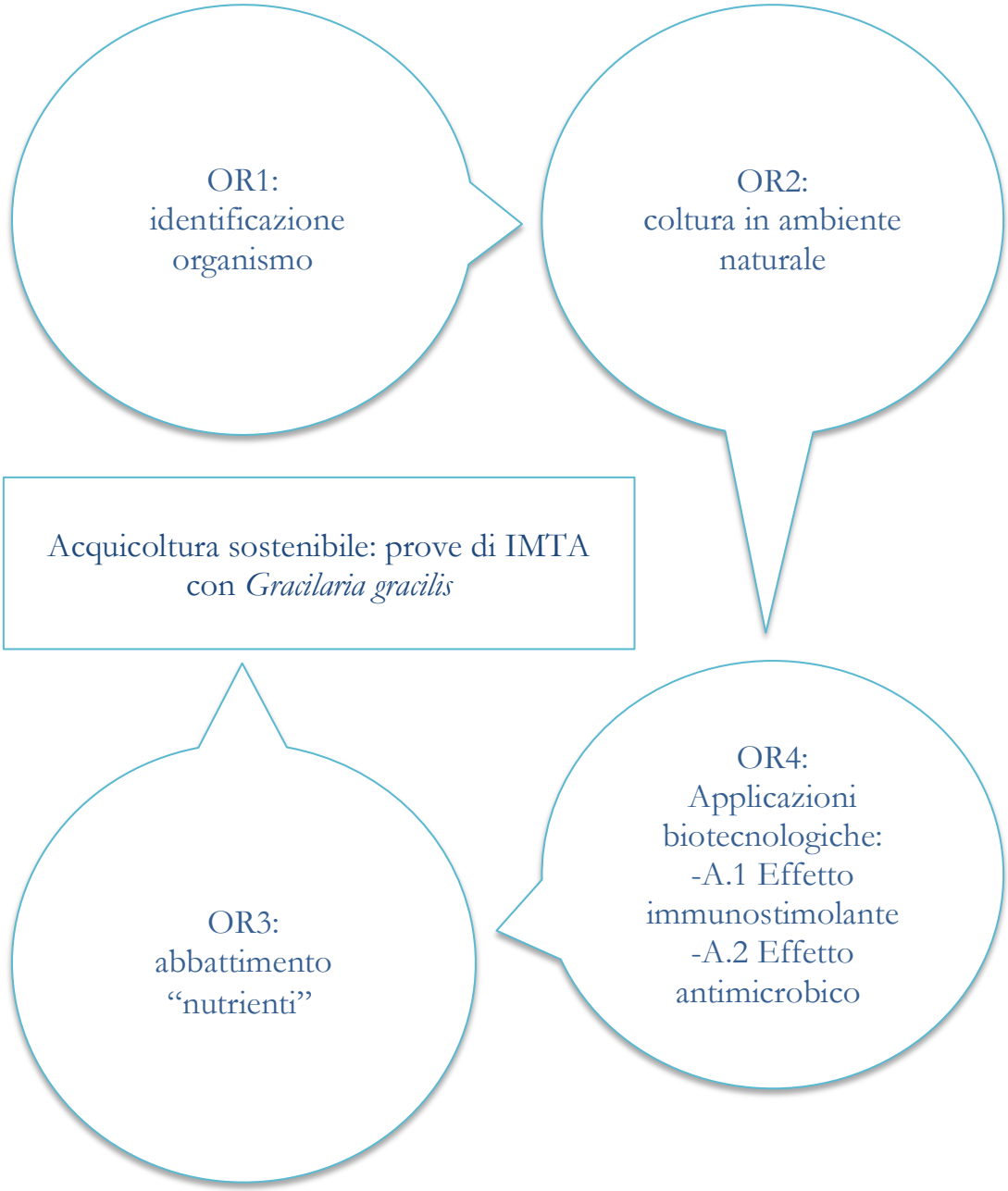


Figura 11; Schematizzazione riassuntiva progetto.

Descrizione generale dell'IMTA

Il miglioramento nella gestione dei reflui dell'acquicoltura è uno degli obiettivi più ambiti al fine di abbattere i rischi ambientali ed economici sopra discussi.

L'abbattimento delle concentrazioni di azoto e fosforo dai reflui di un impianto, contribuendo a mitigare il correlato rischio di eutrofizzazione, il trattamento dei sedimenti, la riduzione del carico in materia organica in sospensione, con conseguente diminuzione del rischio biologico, possono rendere l'acquicoltura una pratica d'allevamento sostenibile a lungo termine [30].

A tale scopo si rendono fondamentali metodi di trattamento dei reflui e tecniche di "bio-remediation" *in-situ* ben strutturati e standardizzati, con organismi che possano ben rispondere alle caratteristiche dei vari impianti di acquicoltura, alla loro localizzazione geografica e alla composizione specifica della zona.

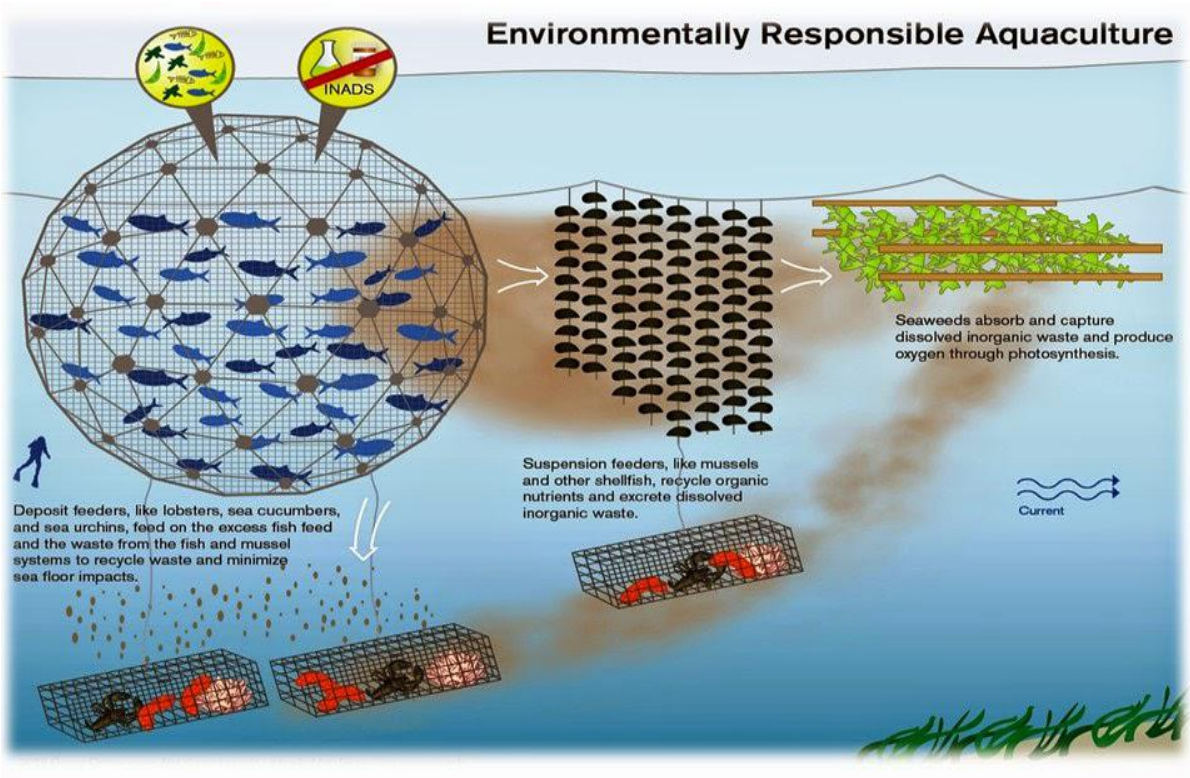


Figura 12; Schematizzazione IMTA in mare. https://budisatriya84.blogspot.com/2014/12/why-sea-farming.html.

Lo sviluppo di sistemi simili implica la necessità di sviluppare ed evolvere pratiche ecosostenibili come l'implementazione dell'Acquicoltura Multi-Trofica Integrata [22,44,51–53].

L'IMTA (schematizzata in figura 12) è un sistema di acquicoltura che prevede la combinazione di organismi fra loro complementari in impianto, in modo tale che ognuno di questi fruisca di sostanze nutritizie derivanti dalle pratiche di allevamento degli altri organismi, trasformando gli "scarti" in prodotti, e abbattendo l'impatto ambientale dell'attività.

I sistemi IMTA generalmente accettati sono composti da allevamento di pesci/gamberi le cui acque di scarico vengono trattate con organismi filtratori, quali molluschi bivalvi, che trattengono il particolato organico, e organismi vegetali che sfruttano per la loro crescita i nutrienti inorganici disciolti nelle acque [22].

Una delle caratteristiche più importanti e interessanti dell'IMTA è di creare un potenziale introito economico all'impianto che la utilizza, al contrario di altri sistemi di trattamento delle acque che presentano "solo" costi aggiuntivi [51,52]. In questo tipo di pratica, infatti, gli scarti delle specie allevate sono trasformati e riciclati per essere utilizzati per la crescita di altri organismi con alto valore commerciale come mitili, crostacei o alghe.

Negli ultimi quindici anni l'integrazione della coltivazione integrata di alghe in allevamento ittico *in-shore* è stata sperimentata e utilizzata in diversi stati, come Canada, Giappone, Cile, Nuova Zelanda, Scozia [52]. In tutta Italia i sistemi IMTA sono completamente assenti a livello industriale e a livello scientifico sono scarsi gli studi a riguardo.

OR1, Identificazione organismo

L'obiettivo realizzativo 1 ha previsto l'analisi bibliografica delle conoscenze pregresse sui diversi organismi utilizzabili in IMTA, e più nello specifico nei reflui di un impianto di acquicoltura, e la conseguente valutazione di applicabilità di queste alle realtà produttive siciliane/italiane.

La scelta dell'organismo è ricaduta sull'alga rossa *Gracilaria gracilis* (Fig. 13) per diverse motivazioni di seguito elencate:

Figura 13; *Gracilaria gracilis*. (http://img.algaebase.org/images/562DFCD009ea4368DDhUL198CDF0/9EaSXtci9XPd.jpg).

- Caratteristiche biologiche ben note [54] e adattamento alle repentine variazioni ambientali [55,56]
- Presenza di popolazioni in ambiente naturale (Pantano di Ganzirri, RNO di Capo Peloro, Messina, Sicilia, Italia), facilmente fruibili ai fini della ricerca [57]
- Metodi di allevamento testati [58,59]
- Possibile utilizzo dell'alga come materiale grezzo per l'estrazione di sostanze dall'alto valore commerciale, come agar e/o composti bioattivi [60–63]

Caratteristiche biologiche di *Gracilaria gracilis*

La *Gracilaria gracilis* è una macroalga appartenente al Phylum Rhodophyta.

Di seguito nella tabella è riportata la classificazione filogenetica.

Dominio	Eukaryota
Regno	Plantae
Sottoregno	Biliphyta
Phylum	Rhodophyta
Subphylum	Eurhodophytina
Classe	Florideophyceae
Sottoclasse	Rhodymeniophycidae
Ordine	Gracilariales
Famiglia	Gracilariaceae
Genere	Gracilaria

Tabella 1; Classificazione *G. gracilis*.

Quest'alga rossa ha distribuzione geografica globale e vive nelle acque temperate di tutto il mondo a profondità comprese fra 0 e 20 metri, in dipendenza alle condizioni fisico-chimiche e idrodinamiche della zona [64]; infatti, fattori quali, temperatura, salinità, irradiazione, sali nutritivi disciolti, presenza di altre alghe ed epifiti ne influenzano il ciclo vitale, la crescita e la composizione chimica.

Il fattore, però, che maggiormente influenza la presenza e la vitalità di *G. gracilis* è la temperatura, questa, infatti, dev'essere compresa fra i 19 e i 23 °C, e non deve superare i 28 °C, temperatura alla quale l'alga arresta la sua crescita mostrando segni di sofferenza.

Gracilaria è caratterizzata da un tipico ciclo vitale di tipo Polysiphonia [65–67], con una fase di tetrasporofito diploide alternata regolarmente con una fase gametofitica aploide,

morfologicamente identica. Nonostante il ciclo vitale di *Gracilaria* sia stato studiato e descritto da numerosi autori [68] la definizione più completa e precisa è stata data da Polifrone [54] ed è stata elaborata in seguito a studi effettuati sulla *G. gracilis* del Pantano di Ganzirri: "Tetrasporofiti diploidi rilasciano tetraspore derivate da eventi meiotici che sviluppano in gametofiti isomorfici. Gametofiti maschili rilasciano nell'ambiente acquatico gli spermazi, i quali perdono i flagelli e sono trasportati dalle correnti per raggiungere i gametofiti femminili e fertilizzare il carpogonio. Lo zigote sviluppa in un carposporofito che rilascia nell'ambiente un gran numero di carpospore che depositano, germinano e producono nuovi tetrasporofiti. Agglomerati sferici di cellule derivano dai primi stadi di sviluppo del giovane tetrasporofito, proliferano e danno vita a nuovi talli, mentre il resto dei tetrasporofiti seguono l'usuale pattern di sviluppo. I talli che originano dagli agglomerati sferici non hanno la capacità di aderire al substrato, e probabilmente formano quella parte di popolazione pleustofitica che vive nello stesso ambiente".

Una rappresentazione schematica del ciclo vitale appena descritto è riportata in figura 14.

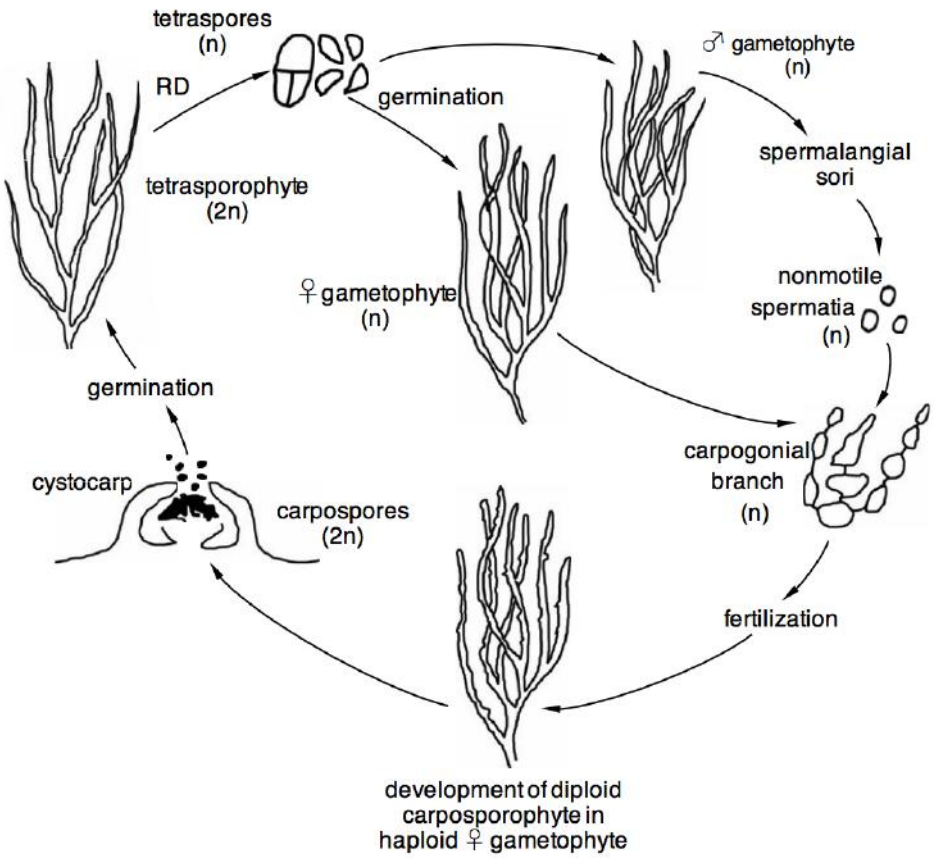


Figura 14; Ciclo vitale di *Gracilaria (disponibile al link: http://www.fao.org/3/a-ag152e/AG152E15.htm).*

Popolazione naturale di *Gracilaria gracilis* nella RNO di Capo Peloro

Descrizione zona di campionamento

L'area di campionamento si trova nella parte della costa nord-orientale della Sicilia (Fig 15).

Figura 15; Localizzazione geografica dell'area di campionamento. Fonte "Google Earth"

Questa zona, denominata Capo Peloro, comprende due ambienti di transizione, denominati pantani (di Ganzirri e Faro), e i canali che li collegano fra loro e il mare. Nella zona, fin dal 1970, si sono susseguite tutta una serie di iniziative protezionistiche volte al mantenimento delle caratteristiche naturali dell'area che hanno condotto all'istituzione nel 2001 della Riserva Naturale Orientata di "Capo Peloro".

Origine e formazione della Laguna di Capo Peloro

I Pantani di Capo Peloro, Pantano Grande o di Ganzirri (Fig. 16A) e Pantano Piccolo o di Faro (Fig. 16B), si trovano sulla costa nord-orientale della Sicilia, circa 9 Km a nord di Messina

Figura 16; A: Pantano di Ganzirri, B: Pantano di Faro.

La loro origine è correlata alla formazione dell'alluvionale della costa orientale dello Stretto di Messina, che si sviluppa principalmente nella località Ganzirri-Capo Peloro e Piano Terranova (Porto e Città di Messina). Il materiale alluvionale ha avuto origine soprattutto da terreni cristallini che si estendono da Capo Rosocolmo fino ai Peloritani, formando il sistema collinoso che si affaccia sullo Stretto. Tutta la pianura costiera, che include i due Pantani, è derivata quindi dall'apporto di sabbie detritiche e dall'intervento delle correnti marine, che hanno prodotto un cordone di dune esteso fino a Capo Peloro dando origine alla laguna costiera; i materiali trasportati dai torrenti che sfociavano nella laguna hanno determinato l'interramento di parte di essa e la sua divisione in più porzioni. E' stato, infatti, ampiamente dimostrato che i pantani in origine fossero quattro. Oltre al Pantano di Ganzirri e a quello di Faro, erano presenti anche il Madonna di Trapani e il Margi, anche se Solino, vissuto nel III secolo d.C., ne menziona solo tre. Il pantano di Margi doveva trovarsi tra quello Madonna di Trapani e quello di Faro e propriamente nella località oggi chiamata Margi; a conferma di ciò sta il fatto che durante lo scavo di pozzi in tale zona, sono state rinvenute delle valve articolate del bivalve edule *Cerastoderma edulis* [69,70]. Dal momento che Maurolico [71] non fa menzione dei quattro pantani, ma solo di due, bisogna dedurre che a quell'epoca il Pantano Margi fosse già stato del tutto, o

almeno in parte, prosciugato da interramenti operati dall'uomo, mentre il Madonna di Trapani fosse stato unificato a quello di Ganzirri formando un unico pantano che è l'attuale Pantano di Ganzirri [69]. Diversi studi sono stati condotti riguardo l'origine dei pantani: Borzì nel 1914 e successivamente anche l'ufficio del Genio Civile di Messina nel 1932, asserirono che le acque dei pantani fossero all'origine dolci, dovute a raccolte di acque freatiche, affioranti nelle depressioni del suolo situato fra le colline e il mare, dalle quali colline tali acque provenivano e divenute a poco a poco salate per afflusso di acqua marina in seguito alla costruzione del canale Catuso nel 1794 (voluta dal Re delle Due Sicilie, Ferdinando I) che mise i pantani in collegamento con il mare. Mazzarelli nel 1938 [72] contestò l'ipotesi del Borzì, dimostrando, in seguito a studi effettuati sul carattere marino della fauna presente anche in tempi antecedenti al 1794, quindi prima della costruzione del suddetto canale Catuso, che le due lagune fossero in origine delle ampie raccolte di acque marine, rimaste più o meno separate dal mare da cordoni litorali mano a mano formatisi, dando così origine ai pantani. Egli affermò poi che le acque freatiche provenienti dalle colline peloritane avrebbero aggiunto il loro apporto a quelle marine diluendole e attenuandone la salinità, e nello stesso tempo combattendo gli effetti di un'eccessiva evaporazione, ma che non erano di sicuro la causa che avrebbe originato i due bacini lacustri [72].

Morfologia e caratteristiche idrologiche del Pantano di Ganzirri

Il pantano di Ganzirri ha una superficie di 338.400 m^2, forma allungata nel senso SO-NE con asse maggiore misurante circa 1670 m, larghezza massima 282 m, minima 94 m, profondità massima mt. 6.50 e un volume di circa 1.000.000 di m^3.

Le acque del Pantano sono in comunicazione con il mare adiacente per mezzo di canali, il primo dei quali, il canale Catuso, scavato nel 1807, è un canale molto stretto, ormai quasi sempre interrato, e solo occasionalmente aperto al mare. Il canale Catuso si trova nella zona sud del pantano, mentre il secondo, denominato Carmine o Due Torri, è scoperto e si trova quasi al confine nord e permette uno scambio di acque superficiali con lo Stretto di Messina; un terzo canale, il Margi, collega il pantano di Ganzirri con quello di Faro, anche se consente un esiguo

scambio fra i due (<1%). Il toponimo Ganzirri deriva probabilmente dall'arabo Gadir (stagno, palude). Tale etimo appare verosimile, dato che nell'antichità l'intera zona dei pantani era paludosa e, solo con i primi insediamenti e la creazione di nuclei abitativi stabili, si determinò una progressiva bonifica del territorio. Il livello del pantano non è stabile; esso infatti s'innalza con la cosiddetta "inchitura", in concomitanza alla fase della corrente montante dello Stretto; e si deprime invece con la "mancatura" o "secchezza", parallela alla fase della corrente scendente dello Stretto.

Gli scambi idrici del Pantano grande con il mare e con il Pantano piccolo, e le precipitazioni influenzano abbondantemente le caratteristiche fisico-chimiche delle acque del sistema lagunare.

I fattori di scambio di masse idriche con l'ambiente circostante il Pantano grande sono i seguenti:

- Maree attraverso il canale Carmine che collega il pantano al mare;
- Acque di dilavamento delle piogge;
- Immissioni di acque di origine antropica;
- Riserva della falda acquifera dolce che raccoglie le acque piovane (lato monte del pantano).

Gli scambi fra il mare e il pantano sono essenzialmente influenzati dai livelli di altezza reciproci, infatti con la corrente "montante" (dir. S-N), quando il livello del mare è maggiore rispetto a quello del pantano, le acque del mare tendono ad entrare nel pantano. Nella situazione opposta, corrente "scendente" (dir. N-S), le acque del pantano fuoriescono verso il mare. Le piogge autunnali e invernali incrementano il livello della falda acquifera che rilascia acque dolci dal fondale del pantano, facendone così diminuire la salinità. Con questo regime di piogge il minimo di salinità è raggiunto a febbraio-marzo con un minimo che si aggira sul valore di 29 PSU. Il livello del pantano in questo periodo è superiore a quello del mare comportandosi da bacino idrico con bilancio positivo (il volume delle precipitazioni supera il volume dell'acqua evaporata), con conseguente fuoriuscita di acque superficiali verso il mare. Non si dispone di dati piezometrici della falda, né dal lato monte né dal lato mare del pantano, pertanto sui volumi che dalla falda si spostano verso il pantano sono state fatte deduzioni basate sul regime delle piogge e

la diminuzione conseguente della salinità del pantano. Bisogna comunque chiarire che quest'effetto può essere conseguito solo se vi è infiltrazione di acqua dolce derivante dalla falda acquifera. Infatti, la parte di acqua dolce derivante dalle piogge e dal dilavamento delle zone circostanti si dispone in superficie per la sua minore densità rispetto all'acqua del pantano. L'aumento conseguente del livello del pantano porterà le acque superficiali a uscire verso il mare, in alcune occasioni prevalendo sulla corrente di marea che solitamente innesca gli scambi fra il pantano e il mare. Questo comportamento che non influisce sulla salinità globale del pantano è rispettato anche per tutti i tipi di effluenti di acque dolci sia di origine naturale sia di origine antropica. Le stime dei volumi rilasciati nel pantano dalla falda acquifera sono state ricavate dai dati pluviometrici disponibili per l'anno 2017, e riportati nella seguente tabella.

Anno	Gen.	Feb.	Mar.	Apr.	Mag.	Giu.	Lug.	Ago.	Set.	Ott.	Nov.	Dic.	Tot
2017	114	93	82	57	33	12	16	22	56	107	101	116	809

Tabella 2; Precipitazioni in millimetri per gli anni 2017.

I principali scambi di volumi idrici (Tab. 3) col mare avvengono grazie alla presenza del canale Carmine, che collega la parte nord orientale del pantano allo Stretto di Messina; nel grafico di seguito riportato sono rappresentati i volumi totali e di scambio.

Canali di comunicazione Pantano di Ganzirri				
	Larg. (m)	Lung. (m)	Prof. (m)	Volume (mc)
Carmine (mare-pantano)	6	250	1	2500
Catuso (mare-pantano)	2.2	150	1	330
Margi (pantano-pantano)	8	1000	1	14000
Volume totale in ingresso				21600
Volume totale in uscita				43200

Tabella 3; Scambi idrici del Pantano di Ganzirri.

Evidenze della presenza di *G. gracilis* nel Pantano di Ganzirri

Il punto di campionamento e prelievo dell'alga da destinare ai diversi esperimenti si trova nella zona settentrionale del pantano di Ganzirri e precisamente all'imboccatura del canale Margi (38°15'49.1"N, 15°37'34.0"E) (Fig. 17).

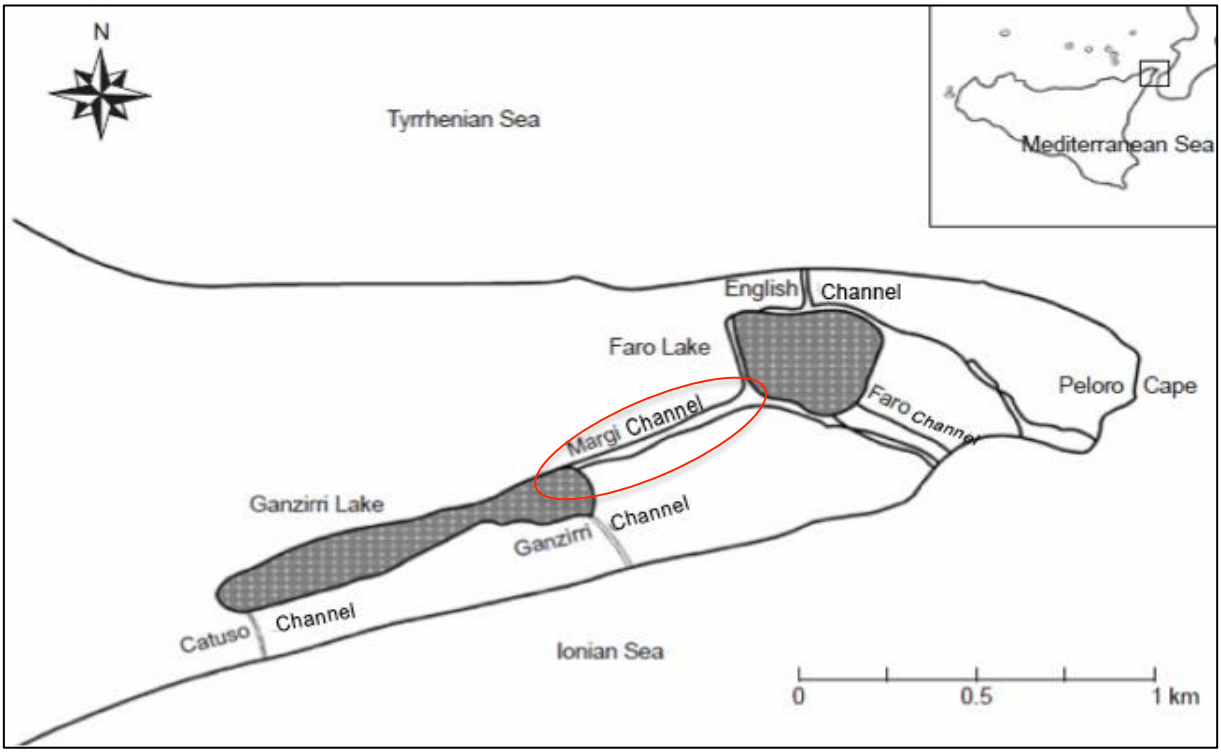


Figura 17; Schematizzazione dell'area di campionamento con indicazione del Canale Margi.

La presenza di alghe rosse nei pantani di Ganzirri e Faro è stata abbondantemente riportata nel corso dei decenni fin dagli anni '50 [69,73]. In diversi casi, fra le specie determinate secondo i classici metodi di identificazione dicotomica, è stata riportata la presenza di *Gracilaria gracilis* nella laguna.

In seguito alla rivoluzione nel riconoscimento specifico con le sempre più performanti tecniche di barcoding [74] la determinazione specifica classica ha perso via via valore, con diversi casi in cui le tecniche non fornivano ugual risultato [75].

La presenza di *G. gracilis* nelle acque dei pantani di Ganzirri e Faro è stata dimostrata e confermata da recenti studi molecolari su campioni di Gracilaria prelevati *in-situ* [57,76].

Metodi di coltura di *Gracilaria gracilis*

Le varie specie di *Gracilaria* sono allevate in scala commerciale principalmente nel sud-est asiatico e nel sud America, specialmente in Cile e Argentina [59,77–79].

Diversi metodi di coltura sono stati sviluppati nel corso degli anni, non solo a fini di sfruttamento economico ma anche per creare un'alternativa ecologicamente sostenibile per la conservazione delle risorse naturali [80].

Riguardo le tecniche utilizzate per la coltura delle specie di *Gracilaria,* ne sono state sviluppate diverse e le principali sono: Coltivazione su fondale, Coltivazione su zattera, Coltivazione su corda, Coltivazione in vasca.

Quest'ultimo metodo si può dividere a sua volta in monocultura e policoltura con specie animali come crostacei (gamberi) e molluschi (mitili) [81,82].

Se per le varie specie di *Gracilaria* i sistemi di allevamento sono ben testati e validati, per quanto riguarda nello specifico la coltura della specie *Gracilaria gracilis* questi sono scarsamente sviluppati e pochi sono gli studi di impianti pilota per la sua coltivazione.

I principali metodi per la coltura di *G. gracilis* sono:

- Coltivazione su fondale
- Metodo dei telai (frame)
- Metodo delle zattere galleggianti (floating raft method)

Coltivazione su fondale

È questo il primo metodo utilizzato per la coltivazione dell'alga oggetto di questo studio, e consiste nell'interramento diretto dei talli di alghe su fondali sabbiosi o fangosi tramite l'utilizzo di tubi in plastica, con i quali si ancorano le alghe al substrato.

Tutti i sistemi d'interramento si basano sulla capacità propria della *Gracilaria* di sviluppare un sistema di tallo sotterraneo che ne permette un solido ancoraggio [58]. Dopo il processo di

"piantagione", i letti di alghe sono mantenuti dalla crescita vegetativa dal sistema sotterraneo del tallo, che è in grado di sopravvivere all'interramento per diversi mesi [83].

Sebbene questo sistema si avvicini il più possibile alla crescita di *Gracilaria* in ambiente naturale, per la sua applicazione sono necessari ambienti acquatici con regimi idrodinamici molto bassi che non ledano la vitalità delle alghe coltivate.

Coltivazione tramite il metodo dei telai "Frame"

Questo sistema consiste di telai metallici di forma cubica posti su fondali sabbiosi nei quali i talli vengono fissati (Fig. 18).

Il sistema, testato da Dural et al., 2006 [84], non ha dato risultati incoraggianti.

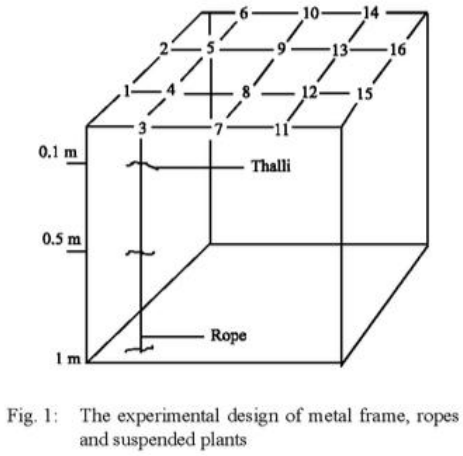


Figura 18; Sistema "Frame" usato da Dural et al., [84]

Coltivazione tramite il metodo dei telai galleggianti "Floating raft method"

Questo sistema consiste di telai di forma rettangolare, costruiti in materiali naturali (bamboo, pino, ecc), per la coltivazione di alghe in sospensione nell'ambiente acquatico (Fig. 19).

Figura 19; "Floating Raft Method" usato da Ganesan et al. [85]

Le zattere contengono un numero variabile di corde parallele cui sono attaccati frammenti vegetativi di talli.

L'aumento della biomassa delle alghe, utilizzando questo metodo, è stato testato da Ganesan et al. [85] e Sanfilippo et al. [86], per diverse specie di Gracilaria, tra le quali anche *G. gracilis*. Ganesan et al. riporta buoni risultati per la *G. edulis*, mentre lo stesso

metodo, testato da Sanfilippo et al. su *G. gracilis*, non ha mostrato risultati comparabili.

Il rapido tasso di crescita, la facilità di riproduzione vegetativa, le scarse informazioni presenti in letteratura e i risultati poco incoraggianti sulla coltura di *G. gracilis* hanno condotto alla sperimentazione di nuovi metodi di coltivazione che stanno alla base dell'OR2.

Agar e altri prodotti da *Gracilaria gracilis*

Gracilaria gracilis, "Multi Product Source"

La *Gracilaria gracilis*, organismo selezionato per il presente studio, risponde alle caratteristiche ricercate anche in termini di potenziale ricaduta economica. Quest'alga, infatti, ha un ottimo valore commerciale grazie all'alto contenuto in agar di elevata qualità e alla possibilità di utilizzarla come cibo o integratore sia per consumo umano che per l'allevamento di pesci e crostacei.

Utilizzate come materiale grezzo da cui ricavare cosmetici, farmaci e agar, *G. gracilis* e congeneri sono coltivate a scopi commerciali in diversi paesi [79,87–92].

Oltre che per il contenuto in agar, la *G. gracilis* rappresenta una fonte di numerosi composti con le più svariate applicazioni. Proprio grazie a tali caratteristiche, quest'alga è stata definita da Francavilla et al. [63] un "Multi Product Source"; infatti, da questa, seppur con marcata relazione stagionalità/concentrazione, si possono caratterizzare i seguenti composti:

• Lipidi e acidi grassi

• Steroli

• Proteine

• Ficobiliproteine

• Fenoli

• Carboidrati

Nello studio condotto da Francavilla et al., è stato evidenziato come nell'alga R-ficoeritrina, acido arachidonico (PUFA), proteine e carboidrati, siano a più alta concentrazione in inverno; mentre in estate è stata determinata la più alta concentrazione di fenoli totali, oltre a un'elevata attività antiossidante e di riduzione dei radicali liberi. Secondo questo e altri studi simili [56,78], la *G. gracilis* può essere considerata una fonte di composti con applicazioni biotecnologiche, nutraceutiche e farmaceutiche.

Come già detto, la *G. gracilis* è fondamentalmente utilizzata come fonte di agar. In conseguenza, e a causa della crescente domanda di agar, si è verificato un rapido esaurimento delle popolazioni

naturali di quest'alga. Vale la pena sottolineare che, per secoli, le biomasse di alghe sono state raccolte esclusivamente da popolazioni naturali; per cui era plausibile un sovrasfruttamento di queste.

Al fine di non danneggiare ed esaurire le risorse naturali, sono nati diversi impianti di coltivazione delle alghe, per poter impiantare nuovi esemplari in sostituzione delle biomasse raccolte.

Oggi oltre il 60% del tonnellaggio di agarofite mondiale è costituito da *Gracilaria* [92], che è coltivata su larga scala in Cile, Cina, Taiwan e altri paesi [5,93]. Di fatto, la coltivazione di queste alghe è attuata attraverso una grande varietà di metodi [59,94], aumentando enormemente le materie prime per la produzione di agar.

Se per altre specie di *Gracilaria*, il "*know-how*" dei metodi di coltivazione è già stato identificato, al contrario, la coltivazione di *G. gracilis* è oggetto di numerosi studi ed esperimenti, volti a comprendere i modi per migliorarne la produttività e la resa in biomassa.

Agar dalla *Gracilaria gracilis* del pantano di Ganzirri

Data l'estrema variabilità di composizione dell'alga, strettamente dipendente dalla zona di coltivazione [95], si è resa necessaria una valutazione delle qualità di *G. gracilis* del pantano di Ganzirri. A tal scopo i campioni di alghe, lavati con acqua corrente e asciugati in stufa a 60°C per 48 ore, sono stati utilizzati per determinare la composizione grezza dell'alga (contenuto in acqua, ceneri, sostanza organica). I risultati delle analisi sono riportati nella tabella 4.

Sample	Peso secco (g)	Cont. Acqua(g)	% cont. Acqua	ceneri (g)	sost.org (g)	% sost. Org.
G1 *	0.30	1.58	84.26	0.07	0.21	76.59
G2 *	0.40	2.48	85.98	0.11	0.29	71.94
G3 *	1.74	1.02	37.47	0.11	1.63	93.84
G4 **	0.66	4.55	87.40	0.28	0.38	57.34
G5 **	0.60	4.54	88.24	0.26	0.35	57.57
G6 **	0.54	3.89	87.83	0.19	0.35	64.61
G7 **	0.62	4.35	87.57	0.24	0.38	61.45

* Campionamento estate

** Campionamento inverno

Tabella 4; Composizione grezza media di *Gracilaria gracilis* (Fonte: Relazione Assegno Ricerca Dott. M. Sanfilippo)

Oltre alla composizione grezza della *G. gracilis* ne sono state determinate le caratteristiche dell'agar.

A tal proposito, si è stabilita una collaborazione con le Società Java Biocolloid, dato il notevole interesse mostrato da questa per la *G. gracilis*.

La Java Biocolloid è una Società indonesiana con sede a Surabaya, leader nella coltivazione di alghe agarofite, nell'estrazione di agar e in tutte le successive applicazioni. Fornisce direttamente le più grandi società multinazionali di prodotti alimentari e farmaceutici ed esporta in oltre cinquanta paesi in tutto il mondo.

Campioni essiccati di *G. gracilis* da circa 1.5 Kg sono stati inviati presso la Java Biocolloid allo scopo di eseguire analisi dettagliate relative alle caratteristiche delle alghe e alla conseguente resa di agar. Dai risultati inviati dalla Società indonesiana Java Biocolloid si evince che *G. gracilis* proveniente dal Pantano di Ganzirri è di ottima qualità (purezza 57.5%) (Tab. 5) e si colloca nella fascia alta di purezza, secondo la scala riportata in tabella 6.

Quality test	**Test #1**	**Test #2**	**Test #3**
Quantità di alga trattata (gr)	200	200	200
Agar estratto (gr)	27.6	24.2	27.9
Resa agar/alga (%)	13.8	12.1	13.95
Purezza (%)	**57.5**	**57.5**	**57.5**
Gel strength (gr/cm2)	650	730	880

Tabella 5; Analisi su *Gracilaria gracilis*.

Scala di Purezza Agar

Eccellente	>60%
Molto buona	55-59%
Buona	50-54%
Accettabile	45-49%
Scarsa	<45%

Tabella 6; Scala di purezza Agar

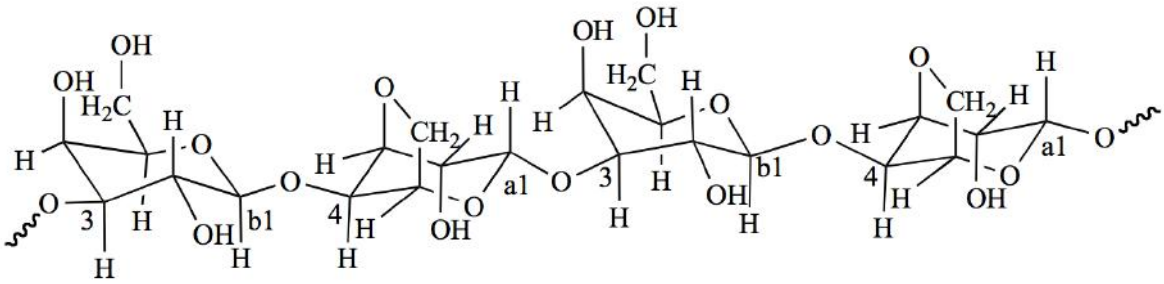
La resa agar/alga, è stata soddisfacente, vista l'elevata purezza delle alghe, così come la forza gel. Considerando che il prodotto agar/agar in commercio ha un gel *strength* medio di 700 gr/cm^2, il potere del gel della *G. gracilis* del pantano di Ganzirri è risultato essere di qualità mediamente superiore al prodotto commerciale [96].

I risultati appena descritti con resa agar/alga molto buona, alto potere del gel e alta purezza dell'alga hanno confermato la *G. gracilis* come organismo target del presente studio.

Agar: caratteristiche e applicazioni

L'agar è un idrocolloide algale, o ficocolloide, con una lunga storia di utilizzo come additivo alimentare gelificante, addensante e stabilizzante. L'agar fu scoperto a metà del diciassettesimo secolo in Giappone, 200 anni prima della sua introduzione nel mercato occidentale. Questo polisaccaride, di alto valore economico, è ora utilizzato come agente gelificante naturale in alimenti, prodotti farmaceutici, applicazioni industriali e in molti altri campi. In Giappone, è noto come "kan-ten", che significa "clima freddo", che si riferisce ai metodi tradizionali di produzione di questo materiale in inverno [97]. L'agar è una molecola della famiglia dei polisaccaridi galattanici lineari, estratto dalle pareti cellulari delle alghe rosse; è un biopolimero costruito su un'unità di ripetizione disaccaride di residui di 3-D-galattosio (G) e di 3,6-anidro-l-galattosio (AG) a 4 legami, con possibile presenza di solfato, metossile, e/o sostituenti piruvati in varie posizioni nella catena polisaccaridica [98].

Sulla catena dei polisaccaridi sono presenti residui carichi, fra i quali più frequenti sono gli esteri di solfato e i gruppi piruvato chetali (Formula di struttura 1).



Formula di struttura 1; Unità strutturale agar

Le proprietà del gel dipendono principalmente dalla quantità e dalla posizione dei gruppi solfati e dalla quantità di 3,6-anidrogalattosio del ficocolloide [61,99].

Le caratteristiche più importanti dell'agar secondo il Dipartimento per l'alimentazione e l'agricoltura delle Nazioni Unite (FAO) [80] sono le seguenti:

1. Il suo grande potere gelificante in un ambiente acquoso permette di formare gel, che sono più resistenti (più forti) di quelli di qualsiasi altro agente gelificante, assumendo l'uso di concentrazioni uguali.

2. La semplice soluzione acquosa ha già il potere gelificante. Non è necessario aggiungere reagenti per produrre gelificazione, come potassio (o proteine come è necessario con le carragenine), o calcio (o altri cationi bivalenti come è necessario con gli alginati). Non sono necessarie concentrazioni elevate di zucchero o ambiente acido (come è necessario con le pectine).
3. Può essere utilizzato in un ampio range di pH, da 5 a 8, e in alcuni casi oltre questi limiti.
4. Resiste molto bene ai trattamenti termici, anche oltre i 100 °C, il che ne consente la sterilizzazione.
5. È un gel in soluzione acquosa all'1,5% tra 32 e 43 °C e non fonde sotto gli 85 °C. Questa è una proprietà unica dell'agar, rispetto ad altri agenti gelificanti.
6. L'agar dà gel inodore e insapore, e perciò può essere usato senza problemi per gelificare prodotti alimentari.
7. Agisce come un fissatore di fragranze e consente il loro mantenimento a lungo termine.
8. Il suo gel ha un'eccellente reversibilità che consente di ripetere la gelificazione e la fusione senza perdere nessuna delle proprietà originali.
9. Si possono ottenere gel trasparenti, che possono essere facilmente colorati, il cui indice di rifrazione può anche essere facilmente aumentato aggiungendo glucosio, glicerina, ecc., dando loro una luminosità attraente.
10. Il gel è molto stabile, non causa precipitati in presenza di certi cationi, come accade agli alginati con calcio.

Le proprietà gelificanti dell'agar sono all'origine delle sue molteplici applicazioni [100] (Fig. 20). Questo biopolimero è ampiamente utilizzato nell'industria alimentare e farmaceutica come agente gelificante e stabilizzante. Presenta anche molte attività benefiche tra cui attività anticoagulanti, antivirali, antiossidanti, antitumorali e immunomodulanti [101].

Tuttavia, l'agar è utilizzato per molte altre applicazioni in diversi campi. Circa il 90% dell'Agar prodotto globalmente è destinato alle applicazioni alimentari [80]. Come additivo alimentare (ad

esempio emulsionanti, stabilizzanti, addensanti e gelificanti) l'agar è approvato dall'UE con il codice E406. Fra le applicazioni alimentari vi sono: prodotti da forno, gomme e caramelle, succhi di frutta, salse e condimenti, gelati, *milk shake*, caramelle, prodotti fermentati del latte, di chiarificazione del vino, pasta *Tokoroten*, bevande gelatinose, insaccati e molti altri [102]. Per il suo basso contenuto calorico, è un ingrediente ideale per la preparazione di alimenti "sani" [103].

Oltre alle applicazioni alimentari, circa il 10% dell'agar è attualmente utilizzato per applicazioni biotecnologiche quali preparazione di terreni di coltura inerti per batteri, microalghe, funghi, colture di tessuti e per separazione di macromolecole mediante elettroforesi [80,104,105].

Altri usi innovativi dell'agar sono stati recentemente sviluppati e proposti. Gli aerogel a base di agar ottenuti da gel umidi utilizzando una tecnologia di essiccazione adeguata (ad esempio processo di essiccamento supercritico) sono stati proposti come promettenti vettori biodegradabili per i sistemi di somministrazione di farmaci [106–110]. Gli usi di Agar in nano-ingegneria sono stati recentemente sviluppati per varie applicazioni. La sintesi di nanoparticelle d'argento usando l'agar, con effetto battericida, può trovare applicazioni nella conservazione degli alimenti e nella medicazione delle ferite [91]. Nanoparticelle monometalliche/bimetalliche di agar (Fe, Cu, Pd, Fe/Cu e Fe/Pd) trovano applicazione nella rimozione di coloranti cationici (blu di metilene e rodamina), da acque reflue dell'industria tessile [92]. Film a base di idrogel incorporati con nanoparticelle di argento (AgNPs) o estratti di semi di pompelmo (GSE), mostrano forte attività antimicrobica contro batteri gram positivi e gram negativi. Questi film sono stati proposti per la preparazione del confezionamento di alimenti funzionali [111].

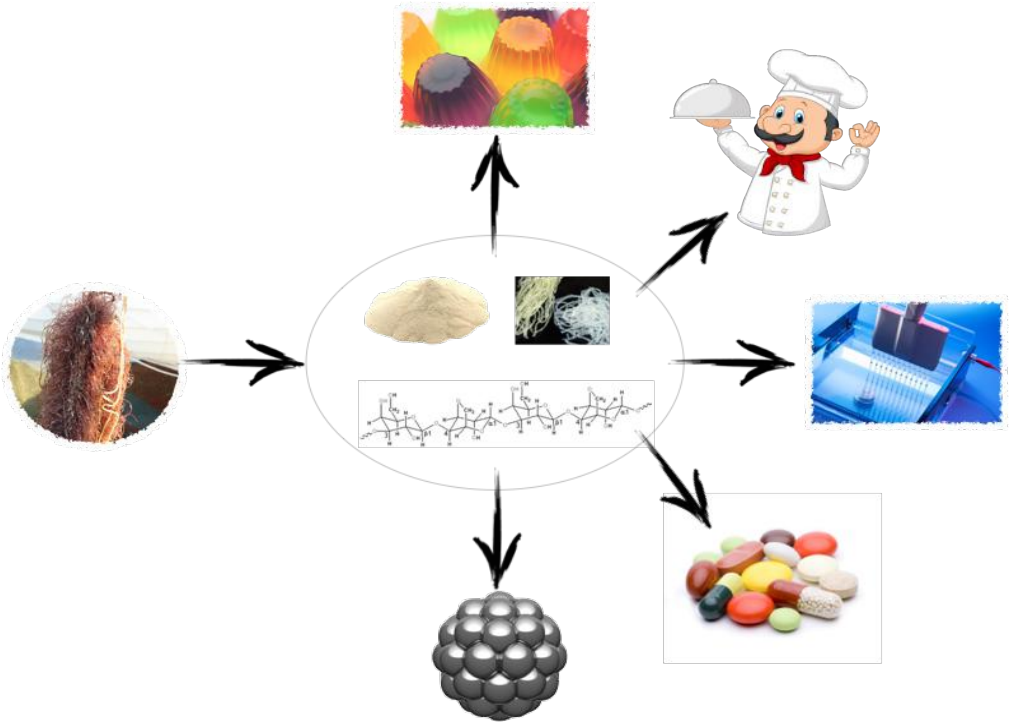


Figura 20; Applicazioni dell'AGAR.

OR2, metodi di coltura in ambiente naturale

È proprio nell'OR2 che la parte sperimentale dello studio prende forma e inizio. In questo obiettivo realizzativo sono stati valutati vari metodi di coltivazione di *G. gracilis*; fra questi ne sono stati testati due in particolare, uno su base della letteratura scientifica già utilizzato su altre specie di *Gracilaria* e uno da noi appositamente studiato e creato.

Introduzione

Le specie algali del genere *Gracilaria* hanno un'importante rilevanza economica per il loro contenuto in agar [54,68,112–114].

La crescente domanda di agar ha incoraggiato, come in precedenza accennato, gli studi sulle differenti agarofite e sulla loro coltura [60]. Diverse specie di alghe rosse sono commercialmente sfruttate per l'estrazione di agar, e queste comprendono principalmente organismi appartenenti alle famiglie *Gracilariaceae* e *Gelidiaceae*. La matrice interna delle pareti cellulari di alghe appartenenti a queste e altre famiglie, quali *Pterocladiaceae* e *Gelidiellaceae*, contiene agar come principale polisaccaride di parete [90].

La produzione globale di agar ha fatto registrare cifre sempre crescenti passando da 6800 tonnellate (82.000.000 $) nel 2002 a 9600 tonnellate (173.000.000 $) nel 2009, derivanti per l'80% da *Gracilaria* e per il 20% da *Gelidium* [115].

Gli agar estratti da *Gracilaria* hanno un potere del gel più basso rispetto a quelli di *Gelidium*, ma l'esaurimento degli stock naturali di quest'ultima alga [89] e la riuscita coltivazione di *Gracilaria* ha orientato l'industria dei ficocolloidi verso l'utilizzo di *Gracilaria* come materiale grezzo per l'estrazione del prezioso agente gelificante. Oltre che per la produzione di agar le alghe rosse sono considerate un prodotto naturale dalle notevoli potenzialità per una dieta sana, in quanto ricche di carboidrati, proteine, lipidi e componenti nutrizionalmente preziosi.

Fra le varie specie di *Gracilaria* la più interessante dal punto di vista del contenuto in agar di buona qualità è proprio la *G. gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Irvine & Farnham [79]. Negli ultimi anni è stata però evidenziata una rapida diminuzione di *Gracilaria* con conseguente sviluppo di varie tecniche di coltura per aumentarne la produzione [54,58,59,79,88,92].

Come descritto in precedenza, la presenza di quest'alga nelle acque del pantano di Ganzirri ne ha permesso un facile approvvigionamento ai fini della ricerca.

Nel presente Obiettivo Realizzativo sono stati testati due differenti metodi per la coltura di *Gracilaria gracilis* in ambiente naturale, uno già riportato in letteratura [85,86] e uno innovativo da noi utilizzato appositamente per gli scopi della ricerca.

Lo scopo del lavoro è di presentare dati sulla crescita dell'alga coltivata con i due metodi in modo da valutare sia l'efficienza di questi sia il potenziale di produzione dell'ambiente "pantano di Ganzirri".

Inoltre lo studio ha rappresentato la base per l'elaborazione dei metodi di coltura da trasferire in vasca di acquicoltura sviluppati nell'OR3.

Materiali e metodi

Area di studio, punti di raccolta e d'impianto

Lo studio è stato condotto, come già detto, nella Riserva Naturale Orientata di "Capo Peloro" (Pantano di Ganzirri).

Il Pantano di Ganzirri ha una salinità leggermente inferiore a quella dell'acqua di mare (media annuale di 31 PSU, compresa tra 21 e 37 PSU) [116,117] e temperature dell'acqua con una media di circa 23,1 °C. I valori di salinità subiscono grandi oscillazioni, in inverno raggiungono valori ipoalini (21 PSU) a causa dell'elevata piovosità, mentre in estate arrivano fino a 39 PSU per la forte evaporazione.

Il pantano di Ganzirri è caratterizzato da due sub-bacini: nord e sud. Il bacino meridionale (profondità media di 3 m) è stato ampiamente sfruttato per oltre un secolo per l'allevamento dei molluschi bivalvi (mitili e vongole)[118], ha sedimenti fangosi e la produzione primaria è sostenuta essenzialmente dal fitoplancton [119]. Il bacino nord rappresenta un quarto della superficie totale, ed è meno profondo (profondità massima 1 m) rispetto a quello meridionale, presenta fondali sabbiosi ed elevata presenza di alghe verdi del genere *Chaetomorpha*. La produzione primaria nel bacino settentrionale è ascrivibile sia al fitoplancton sia alle macroalghe verdi e rosse. I due bacini di Ganzirri, essendo separati l'uno dall'altro da un tombolo di sabbia, sono caratterizzati da regimi idrodinamici diversi [120]. Il pantano è collegato con il Mar Ionio tramite i canali Due Torri/Carmine e Catuso e con il Pantano Faro tramite il canale Margi [116].

Raccolta alghe

La specie utilizzata nel presente studio è la rodophyta *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) Steentoft, Irvine & Farnham. *G. gracilis, G. longa, G. bursa pastoris e Hypnea sp.* sono le alghe rosse più abbondanti nei pantani e sono distribuite entro i primi 3 m dalla riva ad una profondità media di 1 m. [54].

Campioni di *Gracilaria* sono stati raccolti tra la parte settentrionale del pantano di Ganzirri e il canale Margi (Fig. 21).

Figura 21; raccolta *Gracilaria.*

I campioni sono stati ripuliti grossolanamente nell'acqua del Pantano e trasferiti al laboratorio di acquicoltura del Dipartimento in uno speciale serbatoio di trasporto in polietilene (modello Narvalo 120x100x90 cm, INNOVAQUA (Fig. 22 r). In laboratorio le alghe sono state attentamente osservate e pulite, rimossi gli epifiti, e separate da altre specie algali, per consentire una coltura mono-specifica.

Figura 22; vasca di trasporto Narvalo.

Metodi di coltura

Due diversi metodi di coltura sono stati testati:

- il metodo "square raft" o dei telai [85,86].
- il metodo "reste" (sperimentato in questo studio).

Il primo metodo consiste in una zattera quadrata composta di strisce di legno (90 × 90 cm) di pino. Ogni zattera conteneva 8 linee parallele di fune di polipropilene (3 mm) dove sono stati inseriti frammenti vegetativi di talli (figura 23).

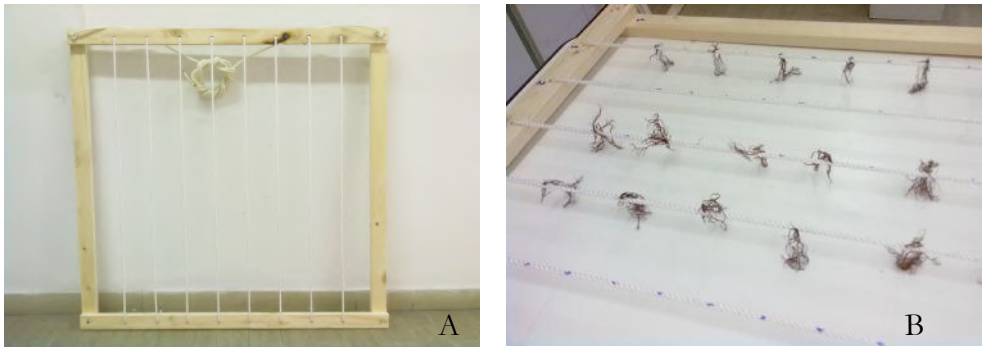


Figura 23; A: Struttura telaio, B: telaio con talli inseriti in posizione.

Il metodo Reste consiste in una rete di nylon, la stessa utilizzata per la coltura delle cozze, in cui i talli sono stati inseriti utilizzando un tubo in PVC di 5 cm di diametro per aprire la rete e un pistone di legno per spingere le alghe all'interno rete (fig. 24). La lunghezza totale di ciascuna resta era di 4 metri. Telai e reste sono stati ancorati saldamente al fondale.

Figura 24; A: Sistema utilizzato per l'inserimento dei talli nella "resta", B: I talli vengono inseriti a mano e poi spinti nella rete, C: "resta" completa e pronta per l'impianto.

Disegno sperimentale

Lo studio è stato condotto da gennaio a dicembre. I telai e le reste, precedentemente preparati, sono stati posizionati in tre diversi siti della laguna di Ganzirri, denominati S1 (38° 25' 90"N; 15° 61' 47"E), S2 (38° 26' 15"N; 15° 62' 10"E) e S3 (38° 26' 11"N; 15° 61' 52"E). I periodi sono stati valutati per confrontare la variazione stagionale della crescita: I, 15 gennaio-15 aprile, II, 15 maggio-15 agosto, III, 15 settembre-15 dicembre.

Analisi parametri ambientali

I parametri dell'acqua sono stati determinati mensilmente. La temperatura e la salinità sono state misurate con sonda multiparametrica (YSI30, Yellow Spring Incorporated, Ohio, USA), il pH con un pHmetro (pH110, XS Instruments, Singapore). L'ossigeno è stato misurato utilizzando una sonda multiparametrica. Per calibrare il sensore di ossigeno è stato utilizzato il metodo Winkler per la determinazione di DO [121]. I campioni in triplicato di acqua di mare sono stati prelevati mensilmente dai siti d'impianto e analizzati per la determinazione dei sali nutritivi disciolti ($N\text{-}NO_2$, $N\text{-}NO_3$, $P\text{-}PO_4$ e $N\text{-}NH_4$) utilizzando uno spettrofotometro UV (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Corporation) secondo i metodi standard [122].

Tassi di crescita

La crescita è stata misurata tramite metodi gravimetrici. Telai e reste sono stati mensilmente recuperati dal sito d'impianto e trasferiti a terra per valutare le condizioni della coltura.

Metodo dei telai: le corde di ogni quadrato sono state pesate con bilancia elettronica FX-3000 (d = 0,01 g).

Metodo Reste: ogni resta è stata pesata con una bilancia elettronica digitale. Prima della pesatura, le colture algali sono state lavate accuratamente nelle acque del pantano, eliminati tutti i corpi estranei manualmente e l'acqua in eccesso drenata appendendo orizzontalmente per 15-20 minuti le colture.

Il tasso di crescita giornaliero DGR (%/giorno) è stato calcolato utilizzando la formula di Dawes et al. [88]:

(1) $$DGR(\frac{\%}{day}) = \ln(W_f/W_i)/t \times 100$$

dove W_f è il peso fresco finale dopo t giorni del periodo di coltura e W_0 è il peso fresco iniziale. La biomassa (Y) espressa come kg di peso fresco su m^{-2} è stata determinata utilizzando la formula modificata di Doty (1986) [123] che includeva il peso iniziale dei propaguli come segue:

(2) $$Y = \frac{(W_f - W_i)}{m^2}$$

dove W_f è il peso fresco finale e W_0 è il peso fresco iniziale. Questa formula è stata usata per la determinazione della biomassa (Y) del metodo dei "telai".

Mentre, al fine di valutare la resa della biomassa nel metodo "reste", in (2) è stato importante applicare un fattore di correzione per consentire il confronto fra i due metodi differenti. Infatti, il metodo reste prevede l'uso di una struttura cilindrica, e per questo motivo, per riportare il volume di un cilindro a una superficie, è stata utilizzata la formula:

(3) $$S_c = 2\pi rh$$

dove S_c è la superficie del cilindro "aperto", r è il raggio, e h è l'altezza, che inserita al posto di m^2 in (2):

(4) $$Y = \frac{(W_f - W_i)}{2\pi rh}$$

Analisi statistiche

I dati sono presentati come medie ± deviazioni standard (SD), delle tre repliche. È stata eseguita un'analisi della varianza a una via (ANOVA) per determinare la significatività delle differenze nel rendimento di biomassa (Y) e nel tasso di crescita giornaliero (DGR) per metodi, stazioni e periodi di coltivazione. Il test HSD di Tukey è stato applicato per un confronto post hoc, al momento del ritrovamento differenze significative ($p < 0,05$). L'analisi di correlazione di Pearson

è stata utilizzata per correlare le relazioni tra Y, DGR e l'influenza dei fattori ambientali. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SYSTAT versione 13 (Systat Software, San Jose, CA).

Risultati

I risultati del presente studio sono presentati in due diverse sezioni, divisi rispetto al metodo utilizzato, e, per ognuno, sono state prese in considerazione diverse stazioni e stagioni. Epifiti e altre specie algali erano trascurabili per i risultati dello studio.

I risultati di ANOVA hanno mostrato variazioni significative nella biomassa (df = 1; F = 55.167; p = 0.001) e DGR (df = 1; F = 13.64; p = 0.001) tra i due metodi di coltivazione esaminati. I risultati dei due metodi hanno mostrato come il "metodo reste" abbia un'efficienza molto più elevata rispetto al "metodo telai".

Metodo dei telai

Il più alto valore di rendimento della biomassa (0,02 ± 0,011 kg m^{-2}) è stato osservato nel primo periodo di raccolta (da gennaio ad aprile) nella stazione S1, mentre il valore più basso (0,006 ± 0,004 kg m^{-2}) è sempre stato rilevato nella stazione S1, ma nel secondo periodo di raccolta (da maggio ad agosto) (grafico 1A). I risultati dell'ANOVA hanno mostrato variazioni significative nel valore della biomassa tra i periodi stagionali (df = 2; F = 4.211; p = 0.027). Il test di Tukey post hoc ha mostrato che i valori della biomassa erano significativamente differenti tra il primo e il secondo periodo (p = 0.022). L'ANOVA non ha mostrato alcuna differenza significativa tra le diverse stazioni (p> 0,05).

La DGR massima (1,33 ± 0,08% $giorno^{-1}$) è stata registrata durante il primo periodo (da gennaio a marzo) nella stazione S1, mentre il valore minimo (0,45 ± 0,35% $giorno^{-1}$) è stato registrato durante il secondo periodo (da maggio ad agosto) nella stessa stazione (grafico 1B). I risultati dell'ANOVA hanno evidenziato variazioni significative nella DGR fra i periodi di coltura (df = 2; F = 3.914; p = 0.034). Il test di Tukey post hoc ha mostrato che il valore DGR era significativamente differente tra il primo e il secondo periodo (p = 0,029). Non c'era alcuna variazione significativa di DGR tra le tre stazioni (ANOVA, p> 0,05)

L'analisi di correlazione di Pearson ha rivelato che la produzione di biomassa aveva una significativa correlazione positiva con il DGR (r=0,845; p=0,001), N-NO_3 (r=0,517; p=0,006) e una significativa correlazione negativa con la temperatura (r=-0,439; p=0.02). La DGR aveva una correlazione positiva con N-NO_3 (r=0,34; p=0,045) e una correlazione significativamente negativa con la temperatura (r=-0,478; p=0,012).

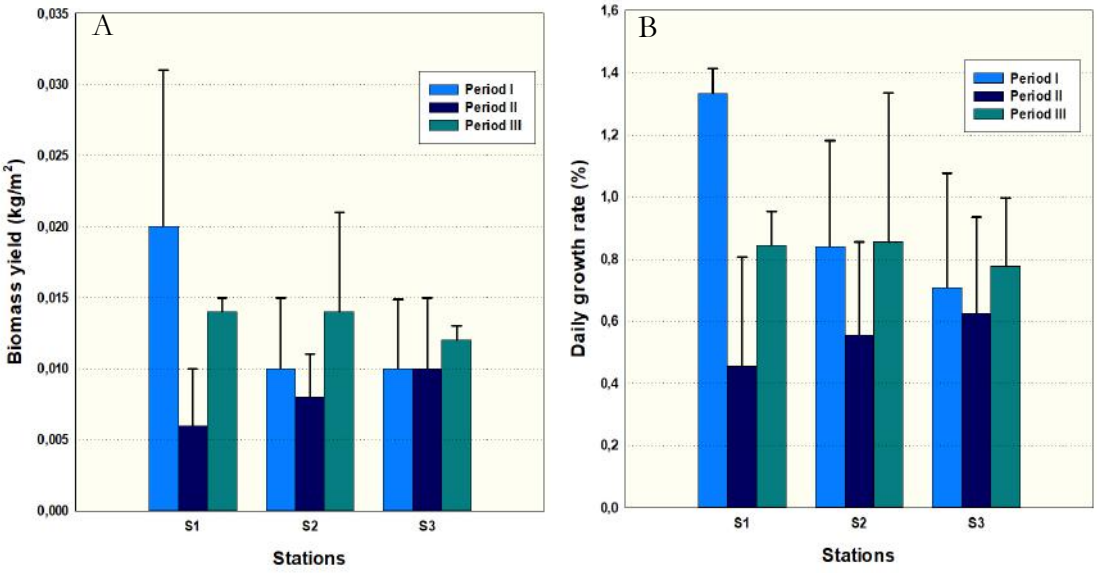


Grafico 1; Metodo Telai: Andamento di biomassa (A) e DGR (B) durante il periodo sperimentale.

Metodo delle reste

Il valore più alto di rendimento della biomassa (4,56 ± 1,19 kg m^{-2}) è stato osservato nel primo periodo di coltura (da gennaio a marzo) nella stazione S1, mentre il valore della biomassa più basso (0,96 ± 0,27 kg m^{-2}) è stato rilevato in il secondo periodo della raccolta (da maggio ad agosto), nella stazione S2 (grafico 2A). I risultati di ANOVA hanno mostrato differenze molto significative nei valori della biomassa tra le stagioni (df = 2; F = 14.771; p = 0.001). Il test di Tukey post hoc ha mostrato che i valori della biomassa erano significativamente differenti tra il primo e il secondo periodo di coltura (p=0,001) e tra il primo e il terzo (p = 0,001). Nessuna differenza significativa è stata rilevata tra le stazioni (ANOVA, p> 0,05).

La DGR massima (2,44 ± 1,79% giorno-1) è stata registrata durante la raccolta del primo periodo (da gennaio a marzo) nella stazione S1, mentre il valore minimo (1,01 ± 0,33% giorno-1) è stato registrato durante il secondo periodo (da maggio ad agosto) nella stazione S2 (grafico 2B). Non vi è stata alcuna variazione significativa della DGR fra i periodi e fra le stazioni (ANOVA, p> 0,05). L'analisi di correlazione di Pearson ha rivelato che la produzione di biomassa (Y) aveva una correlazione significativamente positiva con il DGR (r=0.607; p=0.001), N-NO_3 (r=0.544; p = 0.003) e una correlazione significativamente negativa con la temperatura (r=-0.572; p=0,002). Anche la DGR aveva una correlazione significativamente negativa con la temperatura (r=-0.425; p= 0.027).

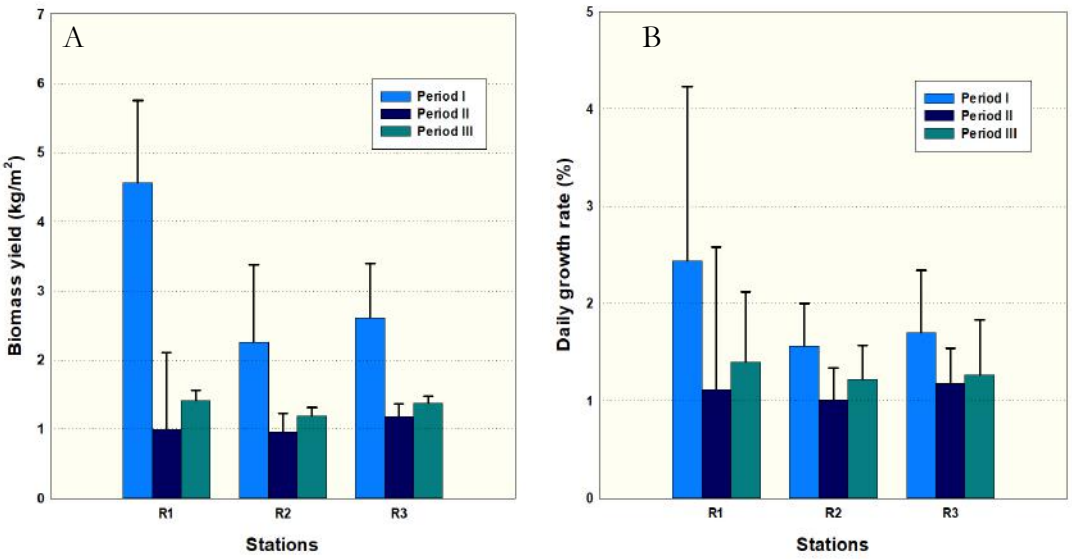


Grafico 2; Metodo "Reste": Andamento di biomassa (A) e DGR (B) durante il periodo sperimentale.

Discussione

Un metodo di coltura delle alghe rosse ampiamente diffuso e studiato è la coltura con telai galleggianti "square raft" [85,88,103]. Nel presente studio, il metodo della coltura con i telai galleggianti è stato utilizzato per la coltivazione sperimentale di *Gracilaria gracilis* nelle acque salmastre della Riserva Naturale di "Capo Peloro". Il metodo di coltura con i telai è stato confrontato con un metodo innovativo, ideato dal gruppo di ricerca, costituito da reti di nylon (le stesse utilizzate per l'allevamento dei mitili) in cui sono stati inseriti talli di alghe. La *G. gracilis* ha un buon potenziale nel settore dell'acquicoltura grazie al suo contenuto di agar di alta qualità; diversi studi effettuati a riguardo hanno dimostrato la maggiore qualità dell'agar di *G. gracilis* rispetto ad altre agarofite [60,61,95,124,125]. *G. gracilis* è anche una fonte di composti bioattivi come evidenziato da diversi autori [63,78]. Queste caratteristiche, combinate con il crescente esaurimento delle popolazioni naturali di Gracilaria [68] e la scarsa letteratura sui metodi colturali [84], gettano le basi per il presente studio, che ha il fine di creare il know-how.

Il confronto tra i due metodi ha dimostrato che il metodo delle reste aveva una maggiore efficienza sia in termini di biomassa (Y) sia di tasso di crescita giornaliero (DGR)(cfr. Grafici 3-4).

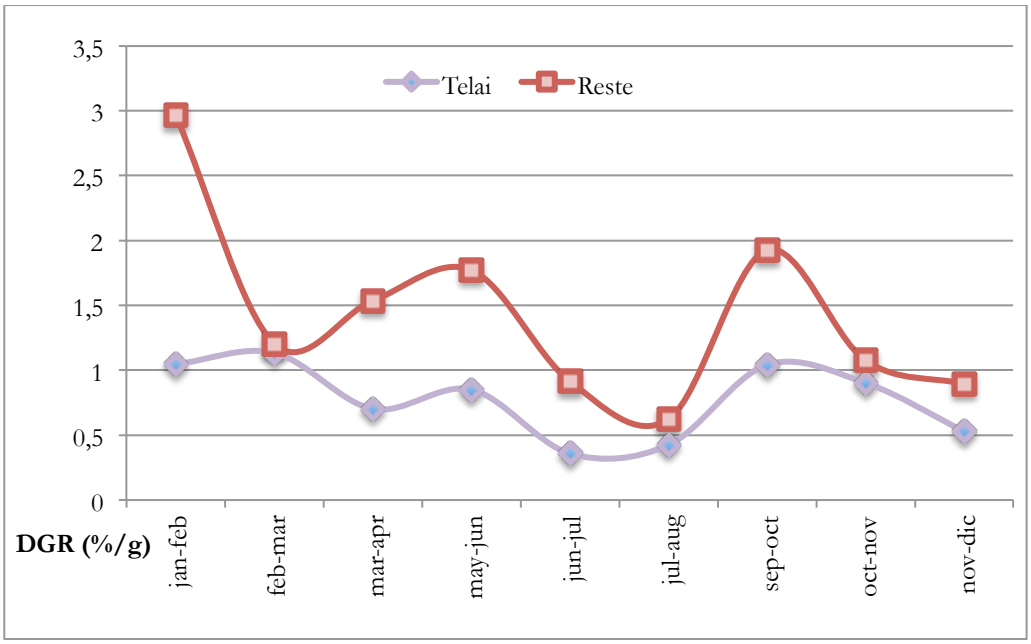


Grafico 3; Confronto fra DGR dei Telai e delle Reste.

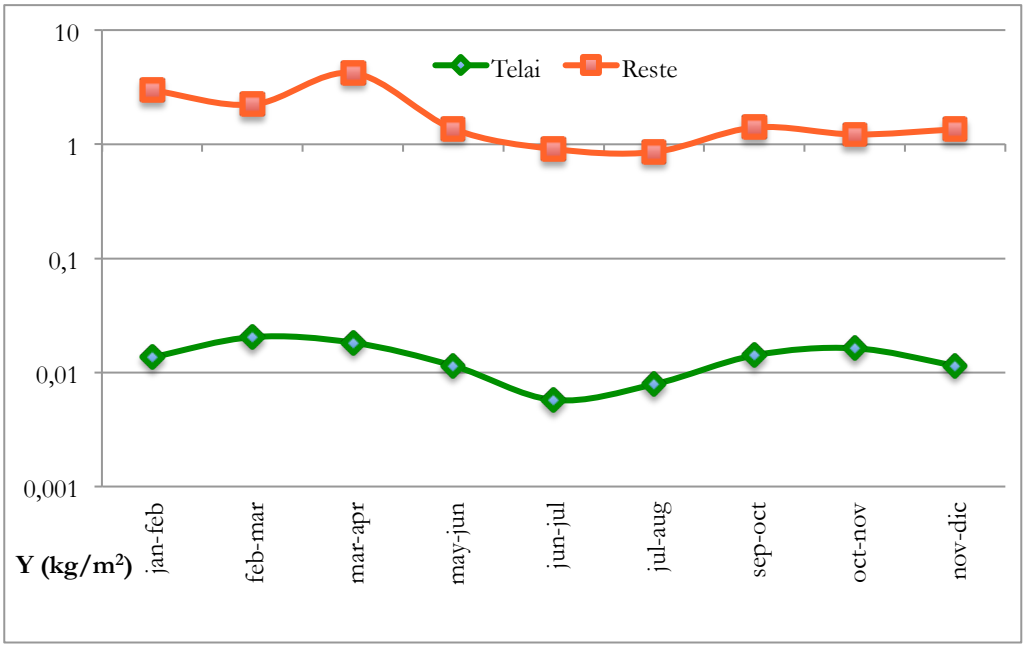


Grafico 4; Confronto fra Y dei Telai e delle Reste.

Questo risultato è strettamente correlato al metodo di coltura; infatti, le altre possibili caratteristiche che influenzano la crescita delle alghe come profondità d'impianto, stazioni e stagioni diverse non hanno influenzato la crescita dell'alga coltivata. È concepibile che la struttura degli impianti colturali abbia fortemente influenzato il tasso di crescita e la resa della biomassa. Il metodo "reste" con la sua struttura tridimensionale grazie alla forma del cilindro consente ai talli di crescere in tutte le direzioni, dando un maggiore volume alla possibile crescita algale (Fig. 25).

In studi precedenti sulle popolazioni naturali della stessa alga nello stesso sito, la presenza di talli macroscopici di *G. gracilis* è stata riportata durante l'anno tranne che nei mesi estivi (da luglio a settembre). La percentuale di copertura algale più elevata (90-100%) si riscontra durante i mesi primaverili (aprile-maggio), subito dopo il periodo di pioggia, con temperature dell'acqua tra 19 °C e 23 °C, mentre l'alga scompare quando la temperatura dell'acqua sale a 28 ° C con la massima durata del giorno [54].

Figura 25; Crescita di *G. gracilis*.

Per entrambi i metodi colturali, la DGR di *G. gracilis* ha riportato chiare tendenze stagionali con valori più elevati nella stagione invernale. I risultati ottenuti nel presente studio sono in accordo con i risultati di altri studi [54,126] che riportavano la maggiore concentrazione di *G. gracilis* in questo periodo, mentre sono in contrasto con i risultati di studi in diverse regioni del mondo [68,84]. Risultati analoghi sono stati riportati per la congenerica *G. edulis* lungo la costa sud-orientale dell'India e il Golfo di Mannar [85,127–130]. La crescita delle alghe è risultata inferiore nel secondo periodo di coltura, da maggio ad agosto, confermando i risultati di Polifrone et al [54]. I fattori che influenzano la crescita di *Gracilaria* sono vari e comprendono irradiazione, salinità, temperatura, ossigeno disciolto, disponibilità di nutrienti e altri [124]. Le elaborazioni statistiche (ANOVA e Pearson) hanno confermato una significativa correlazione negativa tra crescita (per entrambi i metodi di coltura) e temperatura. Ma, nonostante la confermata sofferenza dell'alga alle alte temperature [68,124], la coltivazione ha mostrato una leggera crescita anche nel periodo estivo. Questo risultato fornisce interessanti notizie sulla possibilità di produrre le alghe in estate in contrasto con la riportata assenza di *G. gracilis* in questo periodo dell'anno. Non sono state osservate, inoltre, differenze significative tra le tre stazioni, questo risultato può essere interpretato sia come una relativa stabilità (a medio termine) delle caratteristiche delle acque salmastre del pantano in cui sono state allocate colture sperimentali [131], sia come una buona resistenza delle alghe alle momentanee e rapide variazioni ambientali [55]. La presenza trascurabile di altre alghe deriva dalla posizione sospesa degli impianti, dal movimento delle acque, scarso ma sufficiente [117,120] e dal fatto che *G. gracilis* in acqua salmastra è in grado di formare probabilmente una comunità monospecifica temporale dominante, rilasciando nell'acqua sostanze in grado inibire la crescita di altre specie algali [132].

Conclusioni

I risultati appena discussi sono pertanto di notevole interesse sia per l'applicabilità diretta della tecnica sviluppata nella coltivazione in ambiente naturale di *G. gracilis*, sia per le altre fasi successive. Infatti, come sarà descritto nell'OR3 gli esperimenti sono proseguiti effettuando ulteriori test, prima in laboratorio, mantenendo la tipologia di coltivazione in reste, e successivamente in impianto di acquicoltura.

Dati i risultati ottenuti in ambiente naturale e la dimostrazione della validità del metodo ideato, la *G. gracilis* rappresenta un buon candidato per l'acquicoltura multi trofica integrata (IMTA) e per progetti pilota di coltivazione di questa rodophyta a scopi estrattivi.

"Resta" di *Gracilaria* al momento della raccolta.

OR3, determinazione abbattimento “nutrienti”

L’OR3 rappresenta, in definitiva, la sostanziale verifica di quanto precedentemente riportato. Le sperimentazioni in mesocosmo e in impianto segnano il punto di riferimento per la verifica delle proprietà di quest’alga nell’abbattimento dei sali nutritivi nelle acque di scarico degli impianti di acquicoltura, permettendo un notevole passo verso un’acquicoltura sostenibile.

Introduzione

Dati i risultati ottenuti in ambiente naturale e la dimostrazione della validità del metodo ideato, la *G. gracilis* rappresenta un buon candidato per l'acquicoltura multi trofica integrata (IMTA). Il settore acquicoltura, come in precedenza più volte evidenziato, è in continua crescita con percentuali elevatissime di produzione di specie animali (50%) e di specie vegetali (96%) [133,134]. Fra l'altro la maggior parte della produzione dell'acquicoltura è di origine marina con una percentuale che si attesta quasi al 60% [135].

L'acquicoltura intensiva genera però prodotti di scarto che causano elevati rischi ambientali (vedi introduzione generale) a causa dell'alto carico in nutrienti disciolti nelle acque di scarico.

Tenendo in considerazione che la maggior parte degli impianti di maricoltura persistono in zone costiere, specialmente se protette da possibili avverse condizioni meteo, come estuari, lagune costiere, golfi ecc, lo sversamento di reflui non trattati può causare un peggioramento dei corpi idrici ricettivi, con un aumento non indifferente di concentrazione di "nutrienti" (NO_2, NO_3, NH_4, PO_4). Questo può portare a bloom algali, producendo un effetto "domino" sulle reti trofiche [26,136,137], e nei casi peggiori, eutrofizzazione con importanti conseguenze drastiche sull'intero ecosistema [138]. Per tali motivazioni, risulta di fondamentale importanza lo sviluppo di sistemi che possano permettere di depurare gli scarichi delle industrie acquicolturali.

Fra le soluzioni esistenti, sicuramente la più interessante dal punto di vista economico ma anche dal punto di vista "ecologico" è l'utilizzo di alghe come sistemi filtranti per eliminare l'eccesso di nutrienti disciolti.

L'"algal bioremediation" è un trattamento delle acque reflue ampiamente accettato ed efficiente in diverse parti del mondo [113,139–142]. La coltivazione di specie algali congiunta all'allevamento di specie animali si inquadra nella già descritta pratica dell'IMTA, e questa può avere ricadute interessanti su tre aspetti chiave degli impianti di acquicoltura: efficienza, sostenibilità, aumento del business [141].

Al fine di poter applicare le alghe come "biofiltri" negli impianti di acquicoltura, queste devono rispondere a determinate caratteristiche che le rendono fruibili e utili allo scopo. Le motivazioni della scelta dell'organismo da utilizzare come biofiltro nel presente studio sono state descritte nell'OR1.

La sperimentazione oggetto di questo OR è composta di due diverse fasi, nella prima si è testato il potenziale di crescita e di abbattimento del carico in nutrienti in mesocosmo (acquari), e nella seconda, si è passati alla sperimentazione sul campo nell'impianto di acquicoltura Acqua Azzurra SPA (Pachino, SR, Italia).

Materiali e metodi

Campioni selvatici di *Gracilaria gracilis* sono stati raccolti nel Canale Margi (38° 26' 36" N, 15° 62' 61") della laguna di Capo Peloro tramite l'uso di un forcone di modo da raccogliere i talli di alghe non ancorati al substrato (Fig. 21). I campioni sono stati sciacquati abbondantemente nelle acque lagunari e trasferiti presso il laboratorio di acquicoltura tramite una speciale vasca di trasporto in polietilene (modello Narvalo model 120x100x90 cm, INNOVAQUA) (Fig. 21).

In laboratorio le alghe sono state osservate, pulite e separate da altre specie algali e dagli epifiti, in modo da creare una coltura monospecifica.

Il metodo di coltura scelto per le sperimentazioni è quello delle reste da noi creato e testato già in ambiente naturale.

Esperimento in Mesocosmo

Due vasche di vetro da 300 l di volume (120x50x50h cm) denominate V1 e V2, riempite con acqua prelevata presso il medesimo sito di prelevamento di *Gracilaria*, sono state equipaggiate con appositi sistemi di ancoraggio per le reste (Fig. 26). Una rappresentazione schematica delle vasche contenenti le reste è riportata in figura 27. Il movimento dell'acqua all'interno delle vasche era garantito da pompe di ricircolo (Koralia evo 550/600 gpm, HYDOR USA Inc). Al fine di mantenere costanti i parametri delle acque, l'evaporazione veniva contrastata con l'aggiunta di acqua distillata. Le variabili dell'acqua delle vasche sono state monitorate giornalmente secondo i metodi riportati in Sanfilippo et al [121], tramite sonda multiparametrica IM201 (Idromar s.r.l., Milano, Italy).

Figura 26; sistemi di ancoraggio reste.

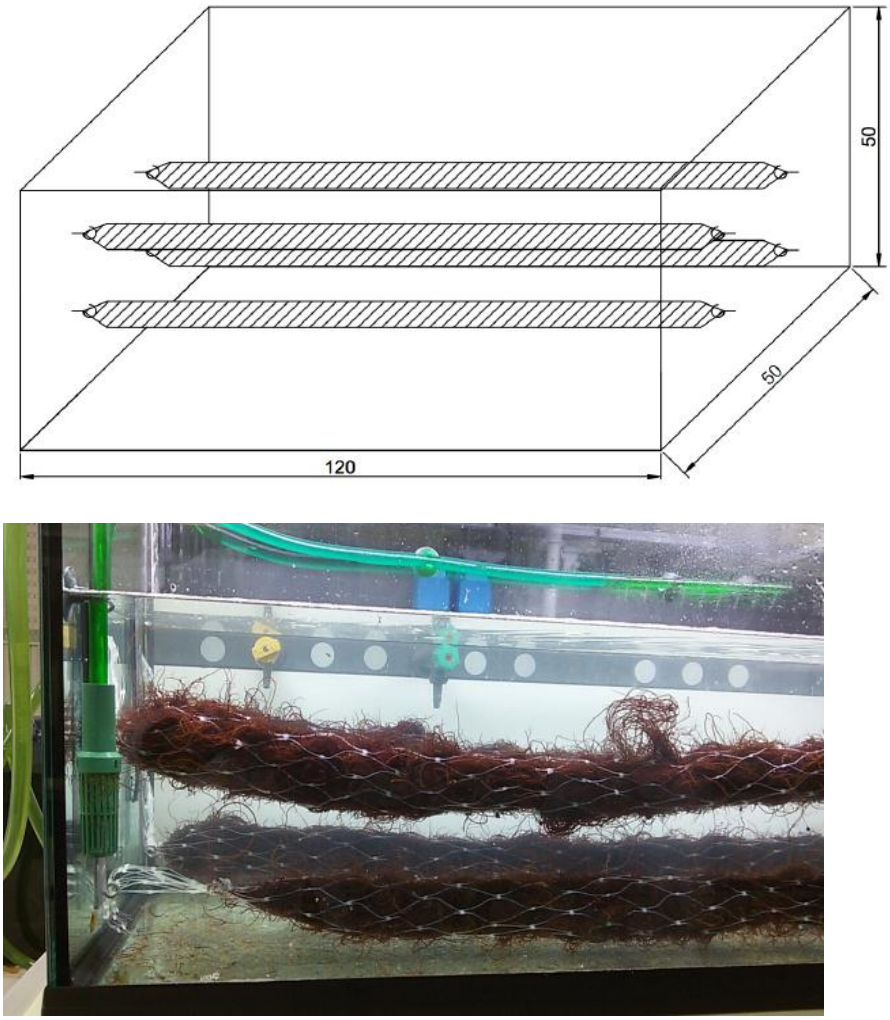


Figura 27; Schema e realizzazione vasca di sperimentazione.

Per le determinazioni dei nutrienti inorganici ($N\text{-}NO_2$, $N\text{-}NO_3$, $N\text{-}NH_4$, $P\text{-}PO_3$), azoto e fosforo totali sono stati utilizzati metodi spettrofotometrici (Varian Cary50 Probe spectrophotometer).

Per valutare la crescita di ogni resta sono state effettuate pesate sul peso umido sgocciolato di ognuna di queste ogni 5 giorni tramite la bilancia elettronica FX-3000 (d= 0.01g).

L'esperimento in mesocosmo ha avuto una durata totale 120 giorni ed è stato suddiviso in due parti. In un primo esperimento (E1) le alghe sono state sottoposte a un fotoperiodo di 5 ore garantito da plafoniere a quattro lampade provviste di Neon t5. Le reste, otto in totale, quattro per vasca, sono state alloggiate in parallelo (Fig. 27) a due profondità, rispettivamente di 30 cm (metà vasca) e 40 cm (in prossimità del fondo).

Il secondo esperimento (E2) ha previsto un notevole abbassamento dell'intensità luminosa utilizzata. Questo è stato ottenuto oscurando le finestre del laboratorio per avere un più efficiente controllo dell'illuminazione in modo artificiale; l'illuminazione è stata ulteriormente ridotta passando da 4 a 2 lampade al neon poste sul soffitto eliminando le plafoniere sulle vasche, e oscurando le pareti delle vasche con plastica scura (Fig. 28). Anche in questo caso sono stati attuati gli accorgimenti per mantenere stabili le variabili dell'acqua.

Figura 28; Particolare di vasca ombreggiata.

Esperimento in impianto

Due vasche in resina da 180000 l di volume (3000x600x130h cm) (Fig. 29) sono state da noi progettate e fatte costruire appositamente per questo studio all'interno del progetto PON INNOVAQUA [86,143] presso l'impianto di acquicoltura Acqua Azzurra.

Nelle vasche è stata convogliata l'acqua di scarico dell'impianto e il tempo di rinnovo di questa è stato mantenuto per tutta la durata dell'esperimento a 2 m^3/h.

Le qualità delle acque sono state monitorate settimanalmente secondo i metodi precedentemente descritti in due punti delle vasche corrispondenti all'acqua in ingresso e all'acqua in uscita al fine di valutare le variazioni del carico in nutrienti principalmente imputabili al "filtraggio" di *Gracilaria*. In concomitanza con i prelievi di acqua le reste sono state sgocciolate e pesate per determinarne la crescita.

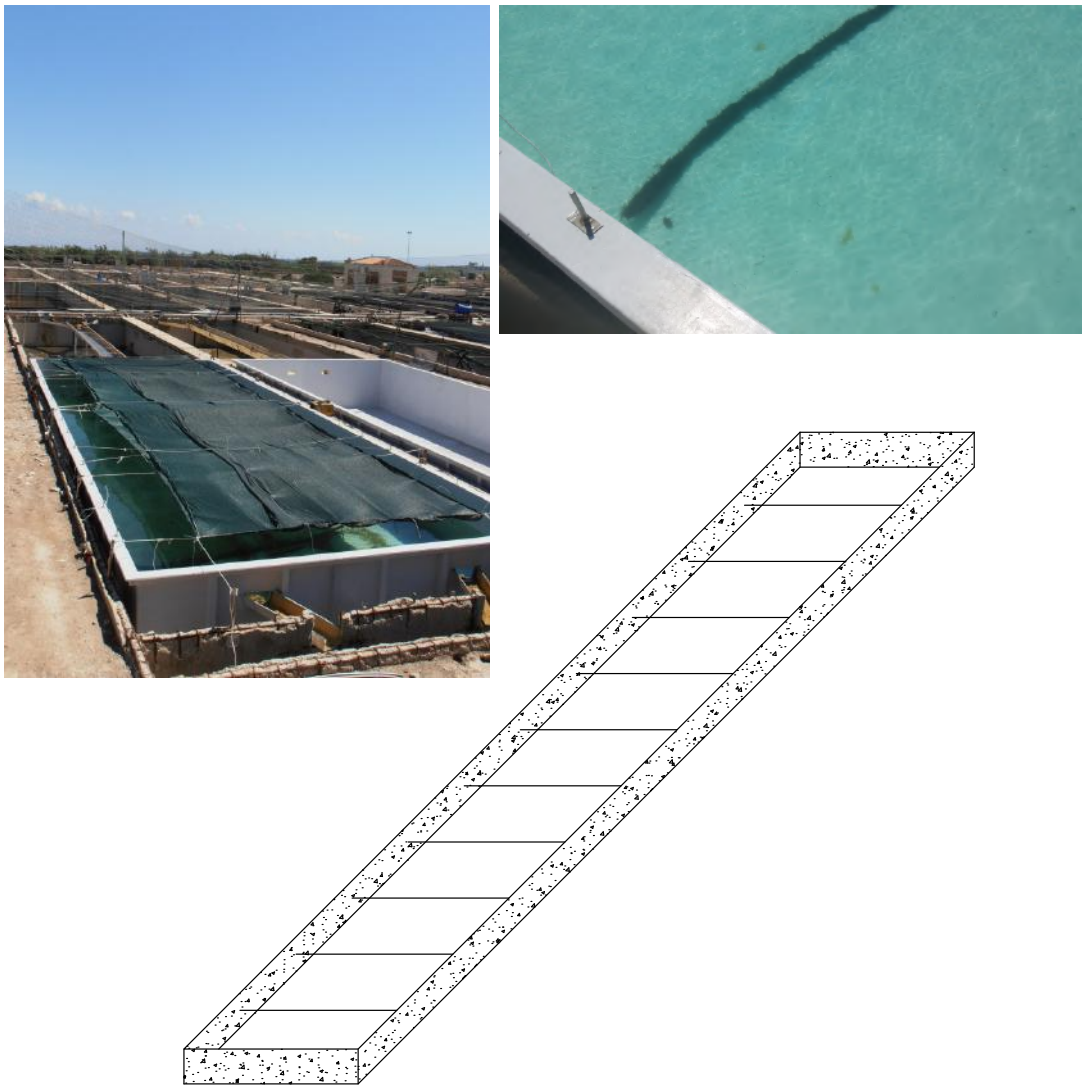


Figura 29; Schematizzazione e realizzazione vasche in impianto Acqua Azzurra.

Ogni vasca è stata equipaggiata con 10 reste di alghe posizionate in parallelo come schematizzato in Figura 32. Le vasche sono state coperte con teli ombreggianti al fine di evitare la fotossidazione delle alghe.

Tassi di crescita

La crescita in termini di incremento giornaliero (DGR) e di biomassa (Y) è stata calcolata come descritto in precedenza.

Analisi statistiche

Anche per quanto riguarda le analisi statistiche si rimanda ai metodi utilizzati nel precedente OR.

Risultati

I risultati ottenuti nel presente OR verranno presentati in due sezioni separate in relazione all'esperimento condotto.

Esperimento in mesocosmo

Le correlazioni statistiche effettuate hanno valutato le differenze fra la biomassa (Y) e il tasso di crescita giornaliero (DGR) e variazioni delle concentrazioni di NO_2, NO_3, NH_4 e PO_4 disciolti nelle due situazioni sperimentali. Il valore medio di rendimento della biomassa più alto (36,05 g m^{-2}) è stato osservato nell'esperimento in cui le vasche sono state "oscurate" (E2), e il valore medio della biomassa più basso (8,76 g m^{-2}) è stato rilevato nelle vasche a maggiore illuminazione (E1). I risultati di ANOVA hanno confermato differenze molto significative fra le due differenti tipologie di vasche in termini di biomassa (p=0,001).

La DGR media più elevata (0,70% $giorno^{-1}$) è stata registrata ancora una volta nell'esperimento E2, e il valore medio più basso (0,20% $giorno^{-1}$) nell'esperimento E1. I risultati dell'analisi della varianza hanno mostrato differenze molto significative fra le due differenti tipologie di vasche in termini di DGR (p=0,001).

Per quanto riguarda invece i risultati delle analisi dei sali nutritivi disciolti, i due esperimenti hanno mostrato come nel primo (E1) la quantità di questi rimaneva stabile con una leggera flessione in aumento (grafico 3); mentre nel secondo esperimento (E2) questi subivano una sensibile e progressiva riduzione (grafico 4).

L'analisi della varianza (ANOVA) ha mostrato significative differenze ($P<0.05$) fra i valori dei sali nutritivi nei due esperimenti e che in generale vi era correlazione fra la crescita (Y e DGR) e la diminuzione delle concentrazioni dei nutrienti disciolti

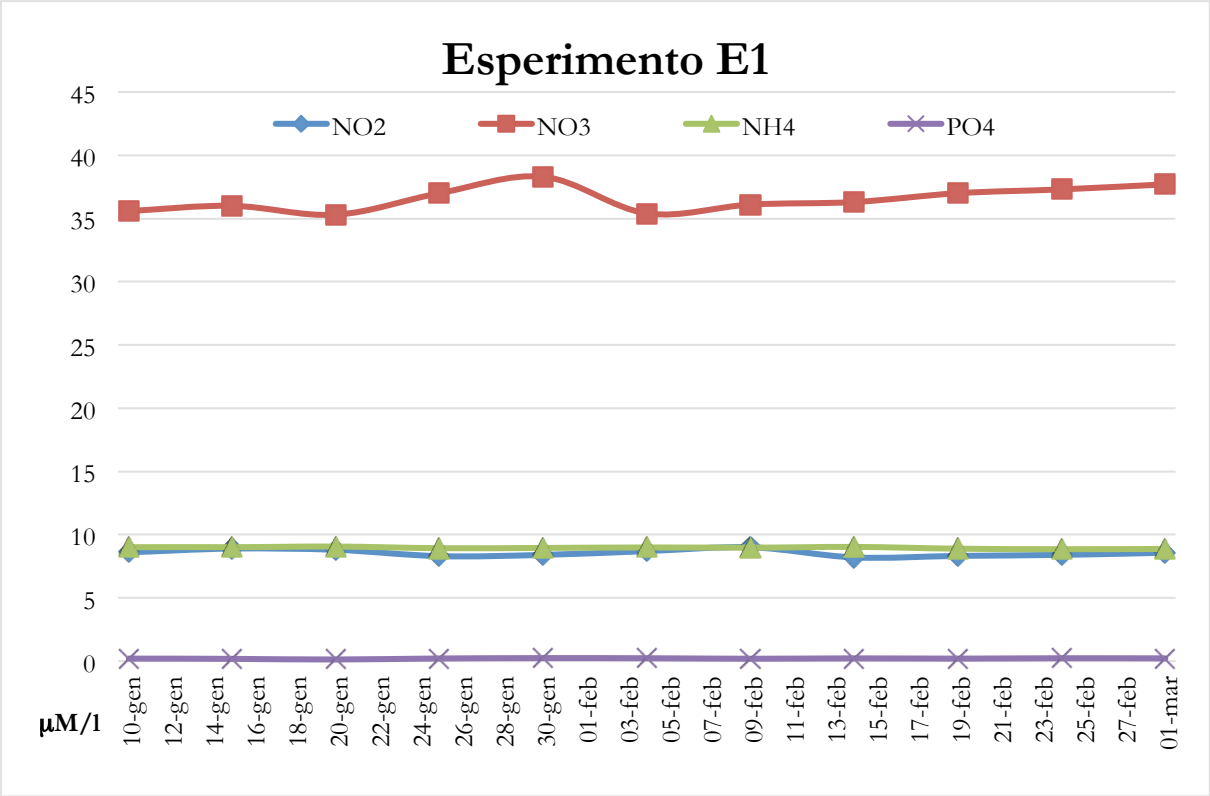


Grafico 5; andamento delle concentrazioni dei nutrienti nell'esperimento E1.

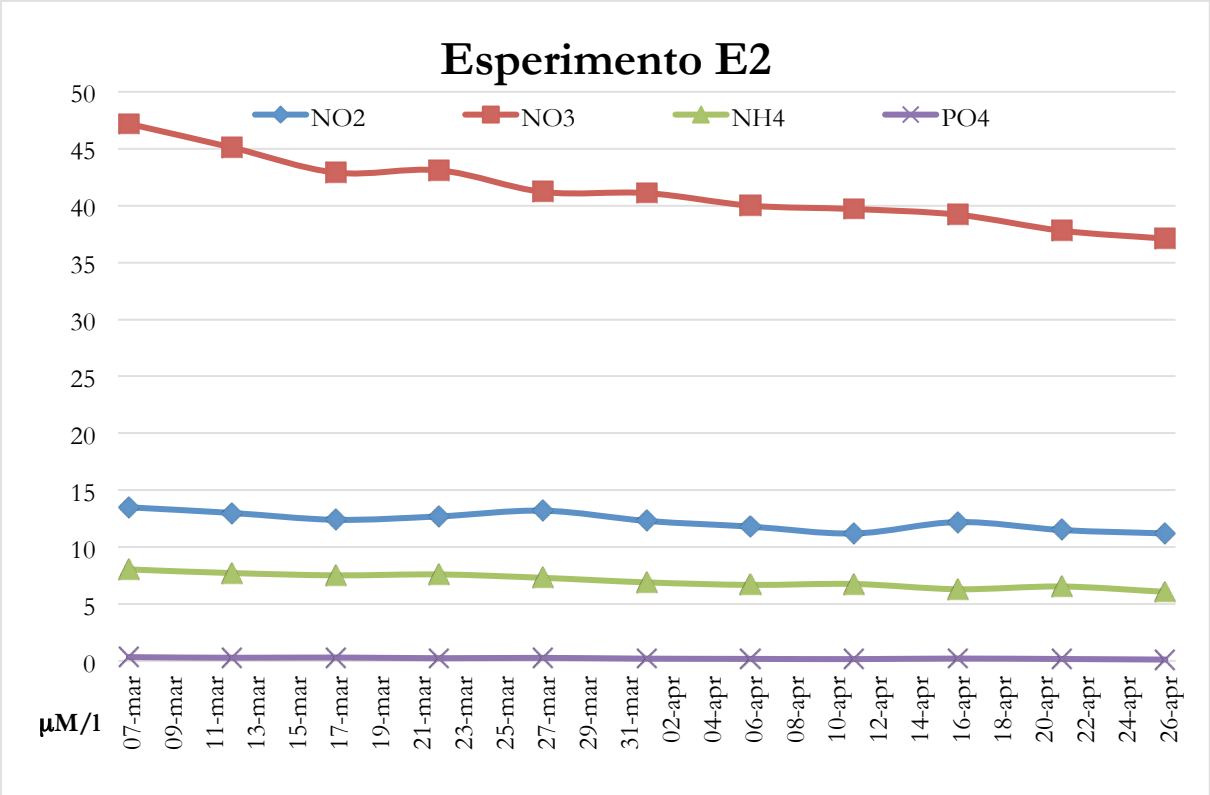


Grafico 6; andamento delle concentrazioni dei nutrienti nell'esperimento E2.

Esperimento in impianto

I risultati ottenuti nell'esperimento sul campo, hanno mostrato come vi sia stata una discreta crescita dell'alga con valori medi di DGR di 0,87 % giornaliero, con picchi massimi di 3,50 % al giorno, e biomassa 0,94 kg m^{-2}, e picchi massimi di 4,06 kg m^{-2}.

L'andamento dei sali di azoto e fosforo disciolti nelle acque di scarico dell'impianto di acquicoltura marina Acqua Azzurra (Pachino, SR) hanno mostrato un andamento coerente con la crescita dell'alga e, infatti, con più marcata efficienza per $N\text{-}NO_2$ e $N\text{-}NH_4$, questi dopo un iniziale periodo di adattamento dell'alga, hanno subito una diminuzione che si è mantenuta costante durante il periodo sperimentale come evidenziato nei grafici 5-6-7-8.

Le analisi statistiche hanno confermato la correlazione significativamente negativa ($r=-0.577$; $p=0,003$) fra accrescimento dell'alga e valori dei sali nutritivi disciolti.

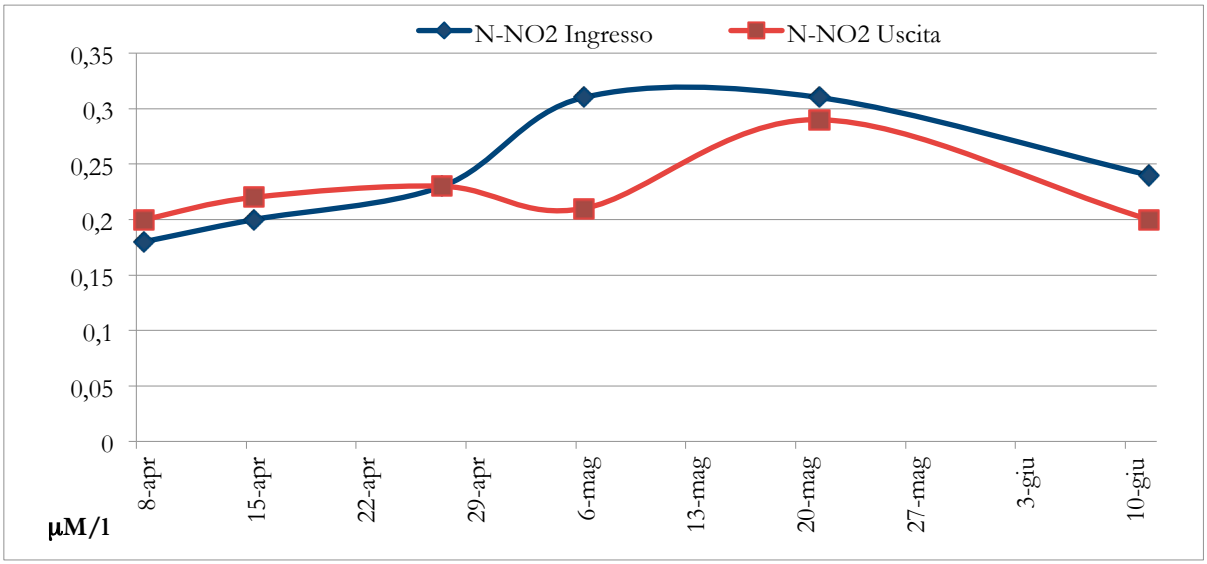


Grafico 7; Andamento della concentrazione dei nitriti nelle vasche sperimentali.

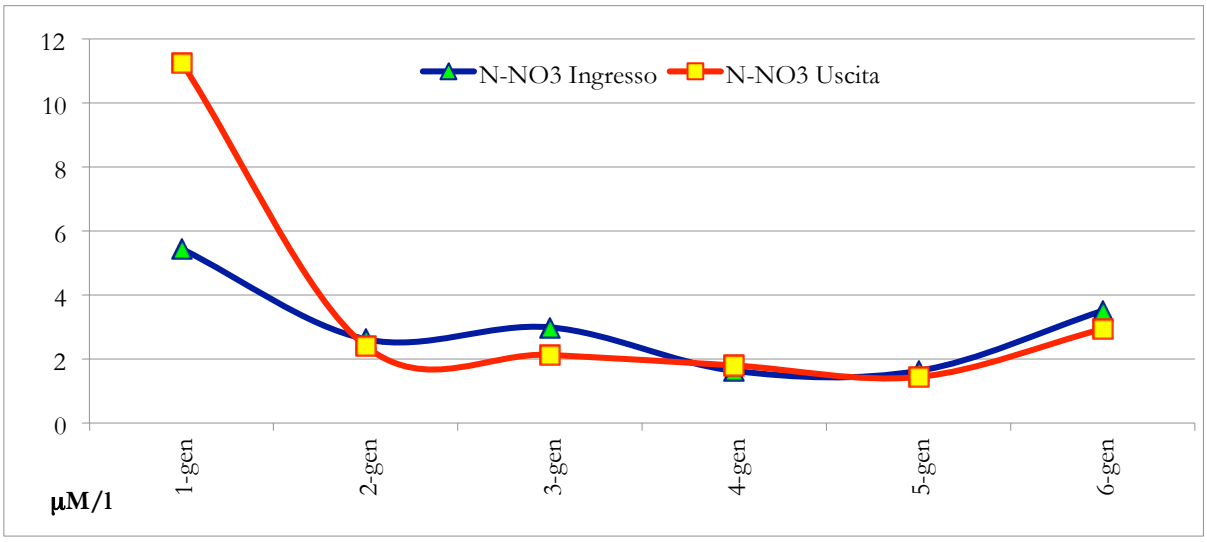


Grafico 8; Andamento della concentrazione dei nitrati nelle vasche sperimentali.

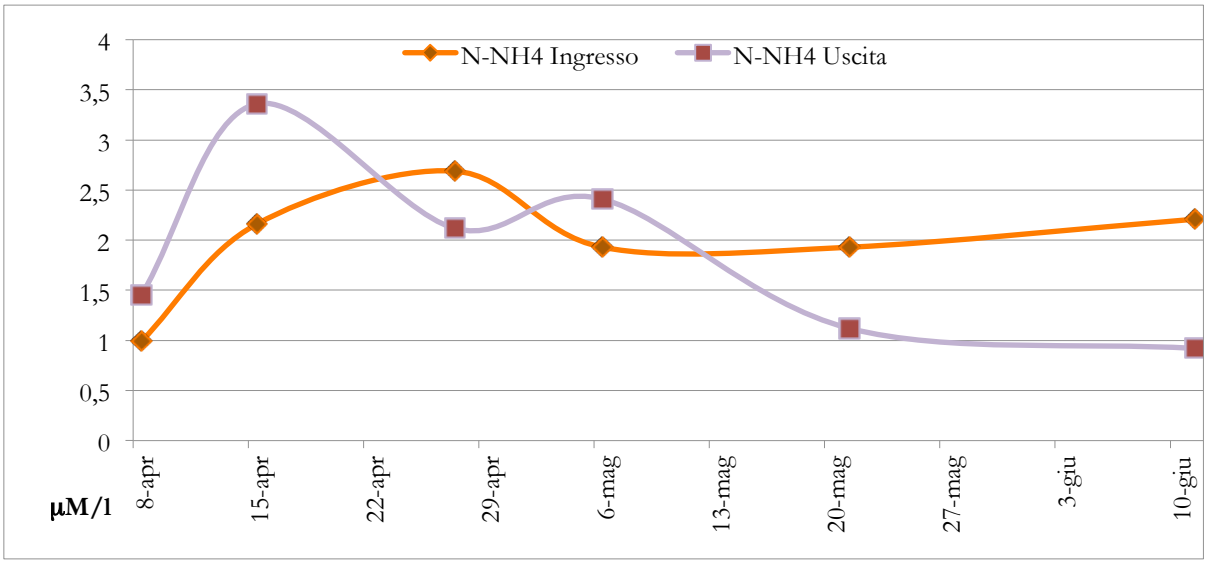


Grafico 9; Andamento della concentrazione dell'ammonio nelle vasche sperimentali.

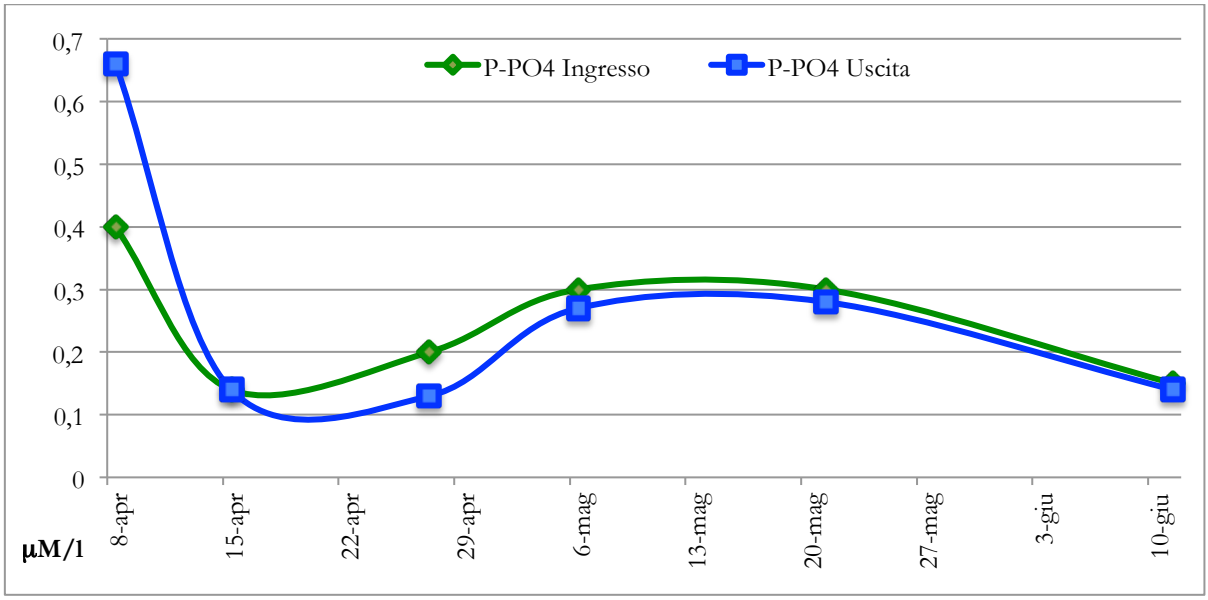


Grafico 10; Andamento della concentrazione dei fosfati nelle vasche sperimentali.

Discussione

Com'è ben noto gli organismi algali necessitano per la loro crescita determinati composti disciolti nell'acqua in cui vivono; questi sono noti come nutrienti. I nutrienti necessari alle alghe si suddividono in tre categorie:

- Macronutrienti (azoto, fosforo e carbonio ecc)
- Micronutrienti o elementi in traccia (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, etc.)
- Vitamine (vitamina B12, tiamina e biotina)

In mancanza, o in quantità ridotta di uno di questi composti, questo si definisce come "nutriente limitante".

La definizione di "nutriente limitante" risale a oltre 100 anni fa alla legge del minimo di Liebig; questa stabilisce che il nutriente che è disponibile nella quantità inferiore rispetto alle necessità dell'organismo ne limiterà il tasso di crescita [144].

Azoto e fosforo sono i due principali fattori limitanti crescita e biomassa algale negli ambienti naturali. Nel caso dei reflui degli impianti di acquicoltura l'alta concentrazione di N e P e C rendono questi ambienti ideali per la crescita algale [145].

Gli esperimenti condotti nel presente OR sono stati programmati al fine di poter determinare le condizioni ideali di crescita della *G. gracilis* in ambiente controllato.

I risultati degli esperimenti in mesocosmo hanno consentito di evidenziare che risultava di fondamentale importanza la riduzione dell'intensità luminosa nell'ambiente di allevamento. Infatti, a fronte di un DGR di circa 0,20%/g e biomassa 8,76 g/m^3 dell'esperimento iniziale in vasche "aperte" (E1), si sono ottenuti un DGR di 0,70 %/g e biomassa 36,05 g/m^3 nell'esperimento con le vasche a minore illuminazione (E2). A conferma della migliore condizione di coltura dell'alga in vasca oscurata e con fotoperiodo ridotto vi sono anche i risultati dei nutrienti disciolti. Questi, infatti hanno mostrato un'importante e progressiva flessione.

Basandosi su questi risultati si è provveduto all'aggiunta per l'esperimento in impianto di una rete ombreggiante sulle vasche di sperimentazione per evitare i fenomeni di foto-ossidazione e ottimizzare le condizioni di sperimentazione sul campo.

I risultati dell'esperimento, condotto presso l'impianto di acquicoltura, hanno mostrato che la *G. gracilis* ben si è adattata alle condizioni controllate, e ha riportato tassi di crescita e biomassa promettenti, seppur lontani da quelli ottenuti con la coltivazione in ambiente naturale riportata nell'OR2.

Per quanto riguarda l'abbattimento del carico di N e P, la netta diminuzione di $N\text{-}NO_2$ e $N\text{-}NH_4$ è ascrivibile unicamente alla presenza degli impianti di reste contenenti *G. gracilis*.

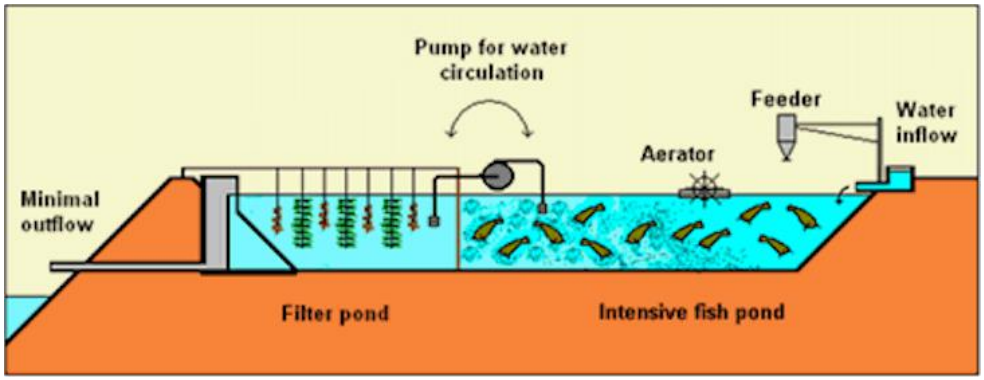
I risultati del presente studio sono supportati da numerose evidenze scientifiche che nel corso degli anni hanno dimostrato le potenzialità delle alghe del genere *Gracilaria* in applicazioni sia dirette (alimento umano, che come alimento in acquicoltura) sia indirette (estrazione di agar e composti bioattivi), nonché di potere depurante [23,26,146–152]. In precedenti esperimenti i potenziali di abbattimento di nutrienti delle varie specie di *Gracilaria* sono stati testati sia in ambienti circoscritti sia in impianti di acquicoltura. Huo et al. [148] in un ambiente semichiuso [152] in impianto di allevamento di *Pseudosciaena crocea* hanno valutato il potere depurante e la crescita di *Gracilaria verrucosa*, con risultati incoraggianti in entrambi i casi. Altri studi hanno valutato il potere depurante di *Gracilariaceae* ottenendo ottimi risultati, fra cui: *G. lemaneiformis* coltivata con pesci *(Sebastodes fuscescens, Ammodyte spersonatus)* in vasca [23], *G. lemaneiformis* coltivata con cappa santa *(Chlamys farreri)* in vasche sperimentali [150], *G. chilensis* coltivata con pesci *(Oncorhynchus kisutch* e *Oncorhynchus mykiss)* in vasche sperimentali [146], *G. gracilis* coltivata con spigola *(Dicentrarchus labrax)* in vasche sperimentali con lento flusso di acqua [153,154].

Oltre al confermato potere filtrante delle alghe del genere *Gracilaria*, è da tenere in considerazione anche il fatto che è stato dimostrato come quest'alga, coltivata in ambienti compromessi per inquinamento da metalli pesanti, abbiano la potenzialità di ridurre drasticamente le concentrazioni di questi [155,156]. Inoltre, in un recentissimo studio [157] la *G. gracilis* è stata

utilizzata nella riduzione e nel riciclaggio di Critical Rare Elements (CRE); gli autori hanno dimostrato come in sole 48 ore sia avvenuta la riduzione del 70% di elementi quali Yttrio, Cerio, Neodimio, Europio e Lantanio a opera della rodhophyta che debitamente trattata ha permesso il riciclaggio del 100% dei CRE rimossi dall'ambiente di coltura.

Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti negli esperimenti dell'OR3 e dalle evidenze scientifiche riportate in letteratura internazionale si può derivare sicuramente che la *G. gracilis* rappresenta un ottimo organismo da sfruttare in acquicoltura multi trofica integrata (IMTA) in impianto di acquicoltura di spigola e orata quale agente "bio-filtrante" per l'eccesso di nutrienti nelle acque di scarico.



OR4, applicazioni biotecnologiche

Come già in precedenza descritto, la principale applicazione di *G. gracilis* è l'estrazione dell'agar; ma, a ulteriore dimostrazione dell'elevato potenziale di quest'alga sono state valutate altre due possibili applicazioni biotecnologiche dell'organismo prodotto in IMTA corrispondenti alle seguenti Attività:

- A.4.1 Gli effetti dell'alga complessata in un mangime commerciale somministrato a *Danio rerio* (zebrafish)
- A.4.2 Gli effetti antimicrobici di vari estratti di *G. gracilis* contro i principali agenti patogeni umani e ittici.

A.4.1, Effetti di *G. gracilis* nell'alimentazione di zebrafish (*Danio rerio*)

Introduzione

La correlazione fra composizione del mangime e benessere degli animali è un campo di ricerca molto interessante e in continua crescita. L'alimentazione ha importanti ricadute su numerosi aspetti della fisiologia delle specie ittiche, specialmente sulle performance di crescita e sulla modulazione del sistema immunitario [158–160].

I pesci sono animali ampiamente studiati per la loro importanza come bioindicatori e come fonte di proteine, sia derivante da stock selvatici che da specie allevate [161,162,171,172,163–170]. Fra questi ricoprono una fetta importante quegli studi che riguardano il potenziale utilizzo di supplementi o integratori, di varia origine (scarti della pesca, alghe, insetti ecc), ai mangimi nella dieta dei pesci allevati. Particolare attenzione è stata posta, soprattutto negli ultimi anni allo sfruttamento di macro e micro alghe a integrazione e/o sostituzione dell'alimento normalmente utilizzato in acquicoltura, al fine di valutare l'impatto di queste sulle performance di crescita e sulla salute del pesce allevato [172–175].

Prodotti di origine algale a integrazione dell'alimento di pesci di allevamento hanno mostrato grandi potenziali soprattutto nel modulare la funzione del sistema immunitario e aumentare la resistenza a diverse patologie [176].

Fra le diverse alghe prese in esame, i risultati più interessanti sono stati ottenuti dall'utilizzo di alghe rosse. Le alghe rosse hanno, infatti, una composizione chimica che rivela un alto contenuto in proteine e composti bioattivi con proprietà farmaceutiche e biomediche [177,178]; fra i componenti principali delle rodophyta enumeriamo, infatti, vitamina C, amminoacidi, peptidi, acidi grassi polinsaturi Ω-3 e Ω-6 [105,179,180]. Supplementi algali (da alghe rosse) complessati in mangimi hanno mostrato inoltre proprietà immunostimolanti per differenti specie di pesci [181,182]. Peixoto et al. [183] hanno dimostrato che il supplemento di *Gracilaria spp.* nella dieta di

spigola (*Dicentrarchus labrax*) aumentava le capacità antiossidante e i valori degli indicatori del sistema immunitario innato.

Come altre alghe rosse la *G. gracilis* è utilizzata come fonte di agar e per tale ragione rientra fra le alghe agarofite [184]; oltre al contenuto in agar, l'alga oggetto di questo studio rappresenta la fonte di numerosi composti naturali utili quali lipidi, acidi grassi, steroli, proteine, ficobiliproteine, fenoli e carboidrati [60,63], tanto da meritarsi il nome di "Multi Product Source".

Nonostante le ben studiate proprietà di quest'alga lo studio della letteratura ha rivelato la scarsa presenza di studi su specie di *Gracilaria* come supplemento nell'alimentazione di pesci. Più nello specifico, gli effetti di *G. gracilis* su attività antiossidante, parametri dell'immunità innata e crescita di pesci sono a oggi sconosciuti.

La presente attività esplora per la prima volta la potenzialità di *G. gracilis* come supplemento nell'alimentazione di pesci e come questa influenza parametri dell'immunità mucosale, enzimi antiossidanti e la correlata espressione genica, e le performance di crescita dello zebrafish (*Danio rerio*) utilizzato come organismo modello [185–187].

Materiali e metodi

L'esperimento è stato condotto in collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Pesca della Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgān, Iran.

Gestione dei pesci e dieta sperimentale

Dopo due settimane di stabulazione nelle vasche sperimentali i pesci sono stati divisi in 12 acquari da 100 L di volume, ognuno contenente 50 esemplari.

L'esperimento, durato otto settimane, ha previsto l'alimentazione di zebrafish con diete sperimentali contenenti diverse percentuali di alga. Gli animali sono stati alimentati fino ad apparente sazietà tre volte al giorno. È stata utilizzata la massima cura per mantenere ottimali i parametri di qualità dell'acqua, mediante pulizia periodica, cambi d'acqua e aerazione continua. Gli esperimenti sono stati condotti nel rispetto delle norme europee sul benessere degli animali.

Raccolta e trattamento di G. gracilis

I talli di *G. gracilis* sono stati raccolti dalla popolazione naturale del Canale Margi nella RNO di Capo Peloro [188–190].

Le alghe sciacquate nelle acque del pantano sono state trasferite presso il laboratorio di acquicoltura dell'Università degli Studi di Messina, dove sono state sciacquate in acqua dolce, e ripulite da altre specie algali ed epifiti. La biomassa algale è stata quindi essiccata in stufa a 45 °C per 72 ore per ridurne il contenuto in acqua e permetterne la successiva polverizzazione in mortaio. La polvere di *Gracilaria* (GP) è stata quindi impacchettata sottovuoto e spedita per la sperimentazione al Dipartimento GUASNR (Iran).

Preparazione della dieta sperimentale

L'alimentazione degli organismi trattati si è basata sull'utilizzo di un mangime commerciale (BioMar SAS, Nersac, France) utilizzata come dieta di controllo. Le informazioni sulla composizione prossimale della dieta basale sono riportate nella Tabella 7 (composizione da informazioni produttore). Per la preparazione della dieta sperimentale, il mangime commerciale è stato polverizzato, addizionato di GP in tre diverse percentuali 0,25, 0,5 e 1%. L'impasto è stato miscelato accuratamente con acqua per formare un composto omogeneo, quindi passato in tritacarne, asciugato all'aria, e frantumato in dimensioni adatte all'alimentazione di zebrafish (0,5-1 mm) [191,192]. L'alimento è stato conservato a 4 °C in buste richiudibili fino al momento dell'utilizzo.

Proximate analysis (%)	
Dry matter	93.6
Crude protein	38.9
Crude lipid	15.0
Ash	11

Tabella 7; Composizione prossimale del mangime utilizzato.

Studio dell'espressione genica

Prelievo dei campioni

Completato il periodo di alimentazione, 15 esemplari sono stati scelti a caso da ciascuna vasca e rapidamente anestetizzati fino a eutanasia utilizzando polvere di chiodi di garofano (0,5 g/l); le teste e le pinne sono state rimosse e il campione di tutto il corpo è stato preparato secondo il protocollo suggerito da Holbech et al. [193]. I campioni sono stati immediatamente conservati in azoto liquido fino al momento dell'analisi.

Isolamento di RNA, sintesi del cDNA e Real Time PCR

La valutazione dell'espressione genica dei geni relativi il sistema immunitario e antiossidante, è stata eseguita utilizzando la RealTime-PCR e basata sul protocollo descritto da Safari et al. [50]. Il protocollo "BIOZOL Reagent" (Bioflux-Bioer, Cina) è stato utilizzato per l'isolamento dell'RNA. La concentrazione di RNA è stata determinata mediante lettura del nanofotometro (IMPLEN-P100) a 260/280 nm e l'integrità è stata verificata mediante valutazione di RNA ribosomiale 28 S e 18 S (rRNA) utilizzando gel di agarosio (1,5%). La DNasi I (Fermentas, Francia) è stata utilizzata per eliminare il DNA dai campioni. Il protocollo "Fermentase" è stato seguito per la sintesi del cDNA [194]. L'analisi della RT-PCR è stata eseguita utilizzando il Master Mix QPCR di Fermentase Maxima SYBR Green (1x) in un iCycler (BioRad, USA). I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software del sistema ottico iQ5 versione 2.0 (BioRad). Le sequenze disponibili in GenBank sono state utilizzate per progettare i primer qPCR per SOD, CAT, il-1β, LYZ e β-actina (Tabella 8). Inoltre, il gene β-actina è stato considerato come gene di riferimento. I livelli di espressione di mRNA relativi di SOD, CAT, il-1β, TNF-α LYZ e β-actina sono stati calcolati con il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. In tutti i casi, ogni PCR è stata eseguita in triplicato.

Primer	Sequenza	Applicazione	Numero di accesso
sod q-PCRF	GGGTGGCAATGAGGAAAG	antioxidant	BC055516.1
sod q-PCRR	GCCCACATAGAAATGCACAG		
cat q-PCRF	GCATGTTGGAAAGACGACAC	antioxidant	AJ007505.1
cat q-PCRR	GTGGATGAAAGACGGAGACA		
il-1β q-PCRF	CGTCTCCACATCTCGTACTCA	immune	AY340959.1
il-1β q-PCRR	GTGTCTTTCCTGTCCATCTCC		
tnfα q-PCRF	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	immune	AY427649.1
tnfα q-PCRR	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC		
lyz q-PCRF	GGCAGTGGTGTTTTTGTGTC	immune	NM_139180.1
lyz q-PCRR	CGTAGTCCTTCCCCGTATCA		
β-actin q-PCRF	AGCAGATGTGGATCAGCAAG	Housekeeping gene	NM_131031.1
β-actin q-PCR R	TACCTCCCTTTGCCAGTTTC		

Tabella 8; Caratteristiche primer utilizzati.

Valutazione dei parametri dell'immunità mucosale

Alla fine delle otto settimane, nove zebrafish a digiuno da 24 ore sono stati scelti a caso da ciascuna vasca sperimentale e dopo anestesia sono stati collocati in sacchetti di polietilene contenenti 5 ml di NaCl 50 mM (Sigma, Steinheim, Germania). La raccolta del muco cutaneo è stata eseguita secondo il metodo suggerito da Hoseinifar et al. [195,196]. Per facilitare la raccolta del muco, il pesce è stato massaggiato delicatamente all'interno delle buste per 1-2 minuti. I campioni raccolti sono stati centrifugati e il surnatante conservato a -80 °C fino all'analisi.

Il protocollo standard di Lowry et al. [197] è stato seguito per la determinazione del livello di proteine totali nei campioni. In questo metodo è stata utilizzata albumina di siero bovino (BSA) come standard. L'assorbanza è stata letta usando uno spettrofotometro (Biochrom, Libra S12) a 750 nm. Per la determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina (ALP) è stato utilizzato un kit commerciale (Ziest Chem Diagnostics kit, Iran). L'assorbimento è stato letto a 405 nm e l'attività ALP è stata calcolata in base alla formula suggerita dal produttore. Il livello di immunoglobuline

(Ig totale) del muco cutaneo è stato determinato secondo il metodo descritto in Hoseinifar et al. [195]. Il metodo si è basato sulla doppia determinazione delle proteine totali, prima e dopo la rimozione delle molecole di immunoglobulina usando una soluzione al 12% di polietilenglicole (Sigma).

Performance di crescita

Dopo otto settimane di alimentazione sperimentale, i parametri di crescita sono stati calcolati in base alle seguenti formule:

Aumento di peso (W_g):

$$W_g = W_2 - W_1$$

Tasso di crescita specifico (SGR):

$$SGR = \frac{100(lnW_2 - lnW_1)}{T}$$

Rapporto di conversione dell'alimento (FCR)

$$FCR = \frac{Mangime\ (g)}{W_g}$$

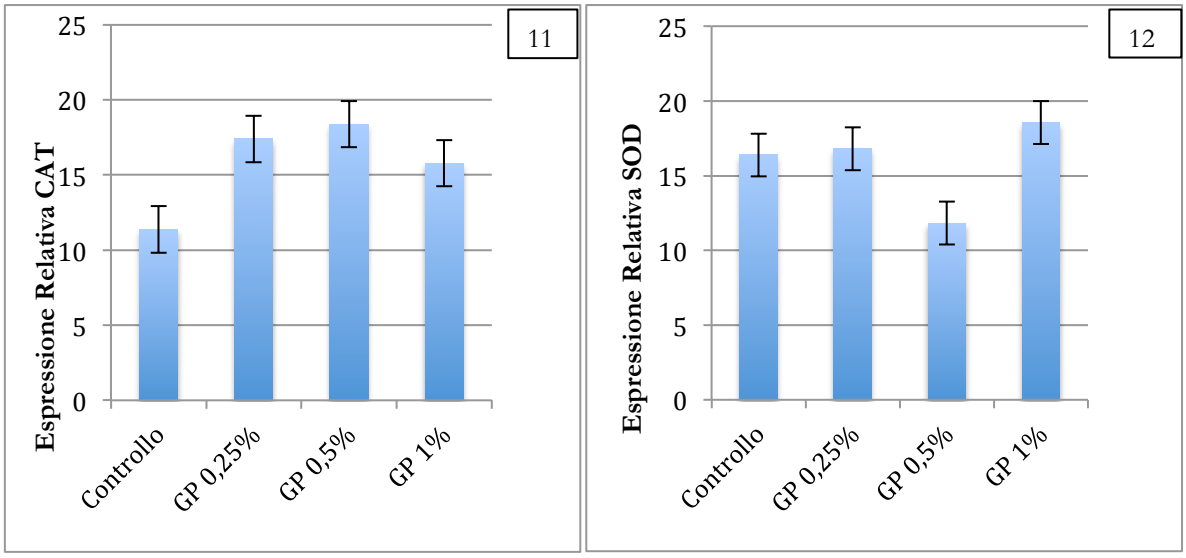
Dove W_1 è il peso iniziale, W_2 il peso finale, e T è la durata della prova di alimentazione.

Analisi statistiche

Le differenze significative (P <0,05) tra i trattamenti, in caso di parametri diversi, è stata valutata mediante ANOVA a una via seguita dal test a intervallo multiplo di Duncan. Prima dell'analisi statistica, la normalità dei dati è stata verificata e confermata. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software SPSS 19 (SPSS, USA).

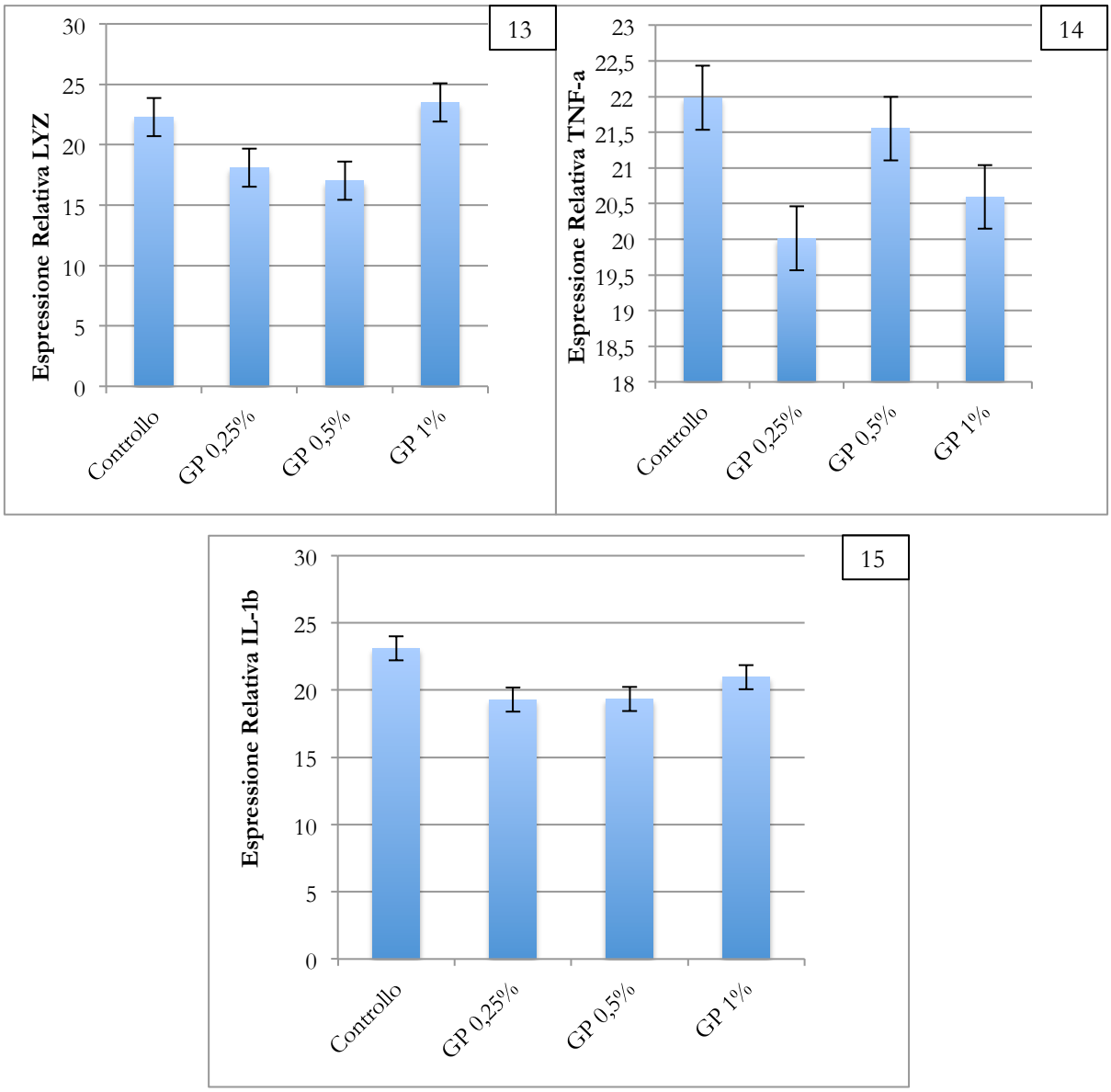
Risultati

Gli effetti di otto settimane di alimentazione di *Danio rerio,* con diverse concentrazioni di polvere di *Gracilaria gracilis* (GP) (0,25-0,5-1%) complessati nel mangime, sui livelli di espressione genica del sistema immunitario (TNF-α e LYZ), antiossidante (SOD e CAT) e interleuchina 1 beta (il-1β) sono riportati nei grafici 11-12.



Grafici 11-12; Espressione relativa dei geni antiossidanti catalasi (CAT) e superossidodismutasi (SOD).

L'espressione dei geni dell'enzima antiossidanti SOD ha mostrato differenze tra il gruppo alimentato con l'integrazione di 1% GP e quello di controllo; mentre l'espressione del gene CAT ha rivelato valori più alti tra i tre gruppi trattati rispetto il gruppo di controllo. Dopo otto settimane di esperimento non ci sono state differenze notevoli tra i diversi gruppi nell'espressione di TNF-α, LYZ e il-1β (grafici 13-14-15) ma in tutti i gruppi sperimentali è stato notato un abbassamento di questi rispetto ai pesci di controllo.



Grafici 13, 14, 15. Espressione relativa dei geni immunitari lisozima (LYZ), fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) e interluchina beta (IL-1β)

La tabella 9 riporta i livelli dei parametri immunitari mucosali di zebrafish trattati con percentuali diverse di GP. I diversi trattamenti hanno dato una significativa up-regulation delle IG totali rispetto ai controlli particolarmente accentuate nel gruppo con 1% di GP complessata nel mangime. I livelli di proteine totali hanno mostrato un andamento simile alle IG. Inoltre, un aumento significativo (P <0,05) dell'attività ALP è risultato evidente nei gruppi alimentati con 0,25 e 0,5% di GP, con i valori più alti in quest'ultimo.

	GP			
	0% (Controllo)	0.25%	0.5%	1%
Ig Tot (mg ml^{-1})	22.38 ± 3.54 ^{b}	27.32 ± 1.93 ^{ab}	29.95 ± 4.65 ^{ab}	36.62 ± 3.81 ^{a}
Protein Tot (mg ml^{-1})	30.04 ± 3.67 ^{b}	35.31 ± 2.77 ^{ab}	35.47 ± 3.84 ^{ab}	43.29 ± 2.43 ^{a}
ALP (U ml^{-1})	193.9 ± 9.6 ^{c}	241.7 ± 4.6 ^{b}	262.2 ± 3.2 ^{a}	205.2 ± 3.7 ^{c}

Tabella 9; Effetto della dieta con mangime complessato con diverse percentuali di GP sui parametri dell'immunità mucosale di zebrafish. Lettere diverse sui valori nella stessa riga indicano differenze significative (P < 0.05)

La tabella 10 riassume i risultati della crescita dei pesci trattati. I gruppi nutriti con GP non hanno mostrato differenze significative (P> 0,05) rispetto al gruppo di controllo. Risultati simili sono stati ottenuti per SGR e per FCR.

Durante le 8 settimane del periodo sperimentale non è stata registrata alcuna mortalità.

	Dietary Gracilaria gracilis powder			
	0% (Control)	0.25%	0.5%	1%
Peso iniziale (mg)	112.5±0.75^{a}	112.19±1.11^{a}	111.38±1.21^{a}	112.20±1.67^{a}
Peso finale (mg)	271.12±12.30^{a}	245.98±10.26^{a}	260.58±1.83^{a}	242.20±7.13^{a}
WG (mg)	158.64±11.87^{a}	133.79±10.95^{a}	149.19±10.67^{a}	130.00±7.29^{a}
SGR	1.57±0.07^{a}	1.40±0.09^{a}	1.51±0.06^{a}	1.37±0.06^{a}
FCR	1.99±0.17^{a}	2.30±0.26^{a}	1.96±0.14^{a}	2.22±0.10^{a}

Tabella 10; Effetto della dieta con mangime complessato con diverse percentuali di GP sulle performance di crescita di zebrafish. Lettere diverse sui valori nella stessa riga indicano differenze significative (P < 0.05)

Discussione

Nella presente attività, è stata invece valutata la potenziale applicazione di *G. gracilis* come integratore alimentare nella dieta di *D. rerio*, al fine di stabilire una nuova possibile applicazione dell'alga.

Il presente studio, per la prima volta, focalizza l'attenzione sugli effetti di diverse percentuali di *G. gracilis* complessata nel mangime di zebrafish (*Danio rerio*) sui parametri antiossidanti, dell'immunità innata, mucosale e di crescita.

La regolazione della risposta immunitaria dei pesci alimentati con GP la rende un potenziale prodotto utile in un'acquicoltura priva di antibiotici, ma che consenta comunque vitalità e salute dei pesci allevati [48,198–200].

Al fine di delineare un quadro quanto più completo possibile della reazione dei pesci all'integrazione di GP nel mangime, fra le varie caratteristiche studiate vi è la relazione tra le tre percentuali diverse di GP e l'espressione dei geni antiossidanti in zebrafish.

Superossidodismutasi (SOD) e catalasi (CAT) sono importanti enzimi antiossidanti che giocano ruoli fondamentali nel contrastare la tossicità cellulare delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) [201].

Per quanto non ci sia stato un innalzamento notevole dell'espressione di SOD nei gruppi trattati con 0,25 e 0,5% di GP, nel gruppo trattato con l'1% GP integrata in mangime ha rivelato un moderato aumento dell'espressione genica dell'enzima SOD. Per quanto riguarda l'espressione del gene CAT, in tutti i trattamenti sperimentali si è assistito a un aumento della sua espressione. Le aumentate espressioni geniche di SOD e CAT portano all'ipotesi che l'integrazione di GP nel mangime abbia avuto effetti positivi sulla difesa antiossidante dello zebrafish; è noto, infatti, che proteine e fenoli algali sono composti con alti effetti antiossidanti [202,203], e la presenza di composti antiossidanti è stata inoltre stabilita in *G. gracilis* da Francavilla et al. [63]. Questi ultimi hanno inoltre testato gli effetti antiossidanti di questi composti tramite tre diversi test in-vitro: FRAP (potere antiossidante di riduzione ferrica), ABTS acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico), e DPPH (2,2-difenil-2-picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity.

Per quanto riguarda invece le espressioni del gene il-1β, LYZ e TNF-α non sono state influenzate dalla somministrazione del GP.

Il-1β è una citochina secreta da diversi tipi di cellule immunitarie ed è coinvolta nei processi infiammatori [204]; infatti, Il-1β regola l'espressione di diversi geni nelle malattie infettive [196,205]. Il mantenimento dei livelli di Il-1β dimostra che le tre diete sperimentali non hanno influenzato ne indotto processi di infiammazione nello zebrafish.

Fra le varie funzioni difensive dei pesci una parte importante è ascrivibile all'attività del muco cutaneo. Le superfici mucosali dei pesci (branchie, cute e tratto gastrointestinale) formano una sottile barriera fisica tra l'ambiente esterno e quello interno e sono importanti siti di esposizione microbica [206–208]. Uno strato di muco sulla cute dei pesci rappresenta la prima barriera a un'ampia gamma di agenti patogeni batterici e virali. Il muco della pelle, infatti, contiene diversi composti biologicamente attivi [209–211]. Il muco è un fluido complesso e la sua composizione varia su tutta la superficie epiteliale. La proprietà antimicrobica del muco epidermico contro i patogeni infettivi (batteri e virus) è stata dimostrata in diverse specie ittiche [212–217] e l'aumento dell'espressione di uno o più dei componenti antimicrobici nel muco epidermico dei pesci è stato osservato in seguito a stress microbico [218,219], supportando così il ruolo del muco epidermico nella protezione dei pesci da agenti patogeni infettivi. La composizione del muco dei pesci varia in base alla specie considerata e all'ambiente in cui vive con diverse percentuali dei costituenti. Le mucine rappresentano i costituenti principali e all'interno della matrice da queste formata si ritrovano numerosi elementi del sistema immune innato:

- Enzimi (lisozima, fosfatasi acida e alcalina, catepsine, esterasi, esterasi lipasi, leucina arilamidasi, valina arilamidasi, tripsina, naftol-AS-BI fosfoidrolasi, beta-galattosidasi, beta-glucuronidasi, N-acitil-beta-glicosaminidasi, alfa-fucosidasi, cistina arilamidasi e beta-glucuronidasi)
- Proteasi (tripsina, catepsina B e L, catepsina D, e metalloproteasi)

- Peptidi antimicrobici [(pleurocidine, piscidine, cathelicidine, defensine e LEAP (liver-expressed antimicrobial peptides)]
- Lectine (congerina, AJL-1, pufflectina, ecc)
- Proteine (lactoferrina, istone H2A e H2B, proteine ribosomiali ecc)
- Immunoglobuline (IgM, IgD, IgT/IgZ)

Le ben note funzioni difensive dei composti appena elencati rendono il muco una barriera di fondamentale importanza per il benessere dell'organismo [206]. Pertanto nel presente studio sono state valutate le variazioni nelle quantità di immunoglobuline, proteine totali e attività di ALP nel muco indotte dalla somministrazione di GP nel mangime.

I risultati degli esperimenti indicano un aumento del valore totale di Ig e proteine totali alla fine del periodo di trattamento con GP all'1%. Inoltre, anche l'attività ALP è risultata più elevata nei pesci con integrazione di GP nel mangime rispetto a quelli di controllo. L'aumento di tali parametri Ig, proteine totali e ALP suggeriscono un netto miglioramento dello stato immunitario dei pesci trattati [220].

I nostri risultati sono supportati da studi precedenti che hanno stabilito i ruoli di varie componenti algali sulla modulazione della risposta immunologica, i parametri di immunità mucosale e il loro coinvolgimento nel mantenimento di condizioni di salute in diverse specie [221,222].

La performance di crescita nello zebrafish alimentato con il GP non ha avuto differenze significative rispetto al gruppo di controllo. Precedenti studi su altre specie di alghe appartenenti al genere Gracilaria [53], hanno mostrato come le performance di crescita sono ampiamente influenzate da molti fattori che comprendono la fase della vita, le specie, le condizioni sperimentali e altri [194].

Conclusioni

In conclusione, è stato dimostrato come l'integrazione alimentare di GP può implementare le attività antiossidanti e contribuire a un potenziamento del sistema immunitario mucosale.

Considerando questi risultati, il basso costo dell'alga e la possibilità di ottenerla da acquicoltura ecocompatibile, o meglio da pratiche di acquicoltura multi trofica integrata, la *Gracilaria gracilis* può essere presa in considerazione come un integratore alimentare per e da acquicoltura sostenibile.

A.4.2, Effetti antimicrobici di estratti di *G. gracilis* su patogeni umani e in acquicoltura

Introduzione

L'oceano copre oltre il 70% della superficie terrestre e ospita una biodiversità eccezionale: oltre un milione di specie marine e circa un miliardo di tipi diversi di microorganismi [223].

Attualmente la maggior parte dei composti utilizzati in tutti i campi di applicazione deriva da risorse terrestri. L'ambiente marino, con la sua incredibile biodiversità e abbondanza di specie, rappresenta un serbatoio infinito di composti che potrebbero essere utilizzati e applicati per migliorare il benessere sia umano sia animale. L'interesse per i composti attivi derivati dagli organismi marini, da utilizzare nei farmaci è un argomento scientifico relativamente nuovo. Durante l'ultimo mezzo secolo, numerosi composti attivi provenienti dall'ambiente marino sono stati studiati, caratterizzati e isolati da batteri, animali e alghe. Alcuni esempi possono essere menzionati, quali esopolisaccaridi, biopolimeri, molecole bioattive e altri composti sono stati isolati dai batteri [224,225] e il loro potenziale biotecnologico è stato valutato [226,227]. Oltre ai batteri e agli animali, anche gli organismi vegetali sono di grande interesse per lo sfruttamento dei loro bioprodotti, utili a numerose applicazioni. È documentato che fin dall'antichità le alghe marine sono state utilizzate per vari scopi [228]. Sono sfruttate come cibo per l'uomo, tradizionalmente nei Paesi dell'Asia orientale, ma recentemente anche nei Paesi occidentali; alcuni esempi sono: nori (*Porphyra* spp.), aonori (*Monostroma* spp. e *Enteromorph*a spp.), kombu (*Laminaria japonica*), wakame (*Undaria pinnatifida*), hizichi (*Hizikia fusiforme*), mozuku (*Cladosiphon okamuranus*), uva marina (*Caulerpa lentillifera*), dulse (*Palmaria palmata*), muschio irlandese (*Chondrus crispus*), alga alata (*Alaria esculenta*), ogo (*Gracilaria* spp.) e molti altri [80]. Le alghe sono anche usate come fertilizzanti; come alimento nell'allevamento di animali, negli allevamenti ittici, per nutrire i pesci direttamente o come supplemento nei mangimi (OR4 A.1) [229–233]; come biomassa per la produzione di biocarburanti nell'acquicoltura multi trofica integrata (IMTA) [234]; nel trattamento delle acque reflue come "biofiltro", per rimuovere composti inorganici e metalli

pesanti (OR3) [60,155]; alcuni estratti di alghe sono utilizzati nelle industrie cosmetiche [235] e per produrre bio-carburanti [236], pellicole per imballaggio alimentare [111], molecole bioattive con attività antiossidante [86,237] e per molte applicazioni biomediche e farmaceutiche [76,78,178,238,239]. Inoltre, le alghe marine sono fonti di tre importanti ficocolloidi: agar, carrageen e alginati.

Le macroalghe marine rappresentano quindi una grande fonte di biomolecole utili in diversi campi biotecnologici, come nelle industrie alimentari e tessili, nella biochimica, nella farmacologia e nella medicina umana e veterinaria. Diversi studi hanno dimostrato che estratti grezzi di alghe hanno potenziali attività anticoagulanti, antibatteriche, antivirali, antiossidanti e antitumorali [177,240–242]. Oltre che per applicazioni farmaceutiche umane, gli estratti algali possono rappresentare strumenti per limitare le notevoli perdite economiche nelle attività di acquicoltura dovute a malattie di origine batterica; per cui la ricerca di nuovi metaboliti attivi contro gli agenti patogeni rilevanti in acquicoltura è aumentata negli ultimi anni [243,244].

I composti contenuti nelle alghe rosse hanno attività antimicrobiche ascrivibili a una varietà di metaboliti, quali polisaccaridi, acidi grassi polinsaturi, composti fenolici, e carotenoidi [240].

Nella presente attività sono state valutate le potenzialità di vari estratti algali da *G.* gracilis al fine di verificare un possibile sfruttamento della biomassa algale di origine naturale (OR1), coltivata in ambiente naturale (OR2) o prodotta in IMTA (OR3) come fonte di molecole antibiotiche. Il potenziale antibatterico di estratti di *G. gracilis* è stato valutato contro diversi patogeni batterici ampiamente diffusi in acquicoltura e rischiosi per la salute umana.

Materiali e metodi

Gli esperimenti condotti nella presente Attività sono stati eseguiti in collaborazione con il PANLAB del Dipartimento BIOMORF (Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali) dell'Università degli Studi di Messina e il laboratorio di Ecologia Microbica dell'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC-CNR) di Messina.

Prelievo della G. gracilis

Ancora una volta i talli di *G. gracilis* sono stati raccolti dalla popolazione naturale del Canale Margi nella RNO di Capo Peloro.

Trattamento dell'alga

Le alghe sciacquate nelle acque del pantano sono state trasferite presso il laboratorio di acquicoltura dell'Università degli Studi di Messina con i metodi descritti in precedenza dove sono state sciacquate in acqua dolce, e ripulite da altre specie algali ed epifiti e infine sciacquate con acqua sterile. La biomassa algale è stata quindi posta in capienti contenitori di legno ed essiccata all'aria per sette giorni per eliminarne il contenuto in acqua. Le alghe sono state poi tagliate grossolanamente, e passate in stufa a 37 °C per tre ore; infine sono state polverizzare.

Estrazione Soxhlet

40 g di alghe in polvere sono state estratte sequenzialmente con 200 ml di diversi solventi (etanolo, metanolo, acetone, cloroformio, ed etere etilico) nell'estrattore Soxhlet (Fig. 30A) fino a quando l'estratto risultava chiaro. Gli estratti sono stati fatti evaporare a secco a pressione ridotta usando evaporatore rotante sotto vuoto (Rotavapor Buchi V700, Fig. 30B) e conservati in frigorifero a 4 °C fino al momento dell'utilizzo.

Figura 20; A: Apparato Soxhlet. B: Rotavapor.

Ceppi batterici trattati

Gli estratti così ottenuti sono stati testati contro quattro ceppi batterici fra cui anche patogeni umani e marini:

- *Vibrio cholerae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Salmonella*
- *Bacillus subtilis*
- *Aeromonas hydrophila*
- *Vibrio fisheri*

Valutazione dell'attività antimicrobica

L'attività antibatterica degli estratti è stata valutata utilizzando la tecnica "agar disk diffusion method" o Kirby-Bauer, come accettato dal Comitato nazionale per gli standard dei laboratori clinici (NCCLS 2000).

I patogeni sono stati fatti crescere per 24h in 10 ml di Nutrient broth (al 3% di NaCl per i patogeni marini). In seguito aliquote di 100 µl di ciascuno sono state inoculate in triplicato in TSA all'1,5 % di NaCl per eseguire il test.

10 mg di ogni estratto sono stati risospesi in 1 ml del solvente appropriato. Aliquote di 20 µl di estratto sono state utilizzate per imbibire i dischetti (diametro 6mm), a 3 differenti concentrazioni (50µg, 100µg, 200µg).

I dischetti sono stati fatti asciugare per 48h, fino alla totale evaporazione del solvente. In seguito sono stati applicati alle piastre inoculate. Come controllo positivo sono stati utilizzati dischetti imbibiti di 30 µl di Cloramfenicolo, mentre per il bianco sono stati utilizzati i solventi (20µl) precedentemente utilizzati per l'estrazione e per la risospensione.

Risultati

Nel presente studio, l'attività antibatterica di cinque diversi estratti (etanolo, metanolo, acetone, cloroformio, ed etere etilico) di *G. gracilis* è stata valutata contro vari ceppi batterici fra cui patogeni per l'uomo e per le specie ittiche.

Le rese dei vari estratti sono riportate in tabella 11.

	Quantità alga (g)	Resa (g)	Resa (%)
Etanolo	39.8714	0.5582	1.4
Metanolo	50.4235	4.9415	9.8
Acetone	38.0980	0.1943	0.51
Cloroformio	41.8196	0.2551	0.61
Etere etilico	35.8	0.1432	0.4

Tabella 11; Rese estratti *G.gracilis*.

Fra i diversi ceppi batterici target, l'unico per cui tutti gli estratti hanno mostrato evidente e significativa attività inibitoria era *Bacillus subtilis*. I risultati dell'alone inibitorio dei vari estratti sono riportati in tabella 12. I vari estratti hanno mostrato attività diverse con potere decrescente nell'ordine: Etanolo>Cloroformio>Etere etilico>Acetone>Metanolo.

		Vibrio cholerae	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella*	*Bacillus subtilis*	*Aeromonas hydrophila*	*Vibrio fisheri*
Etanolo	50µg	-	-	-	10 ± 0,00	-	-
	100µg	-	-	-	14.6 ± 0.5	-	-
	200µg	-	-	-	19 ± 1	-	-
Metanolo	50µg	-	-	-	7.6 ± 2	-	NC
	100µg	-	-	-	9.6 ± 0.5	-	-
	200µg	-	-	-	12.6 ± 1.1	-	-
Acetone	50µg	-	-	-	10 ± 0.00	-	-
	100µg	-	-	-	11.6 ± 2.8	-	-
	200µg	-	-	-	13.6 ± 3.5	-	-
Cloroformio	50µg	-	-	-	10.3 ± 0.5	-	-
	100µg	-	-	-	15.6 ± 3	-	NC
	200µg	-	-	-	17.6 ± 2	-	NC
Etere Etilico	50µg	-	-	-	10 ± 1	-	NC
	100µg	-	-	-	10.6 ± 2	-	-
	200µg	-	-	-	15.6 ± 3	-	-

Tabella 12; attività inibitoria la crescita dei vari estratti di *G. gracilis*. I valori sono espressi in mm ±deviazione standard. NC: non considerabile.

Discussione

Le alghe sono organismi eucarioti acquatici riconosciuti come una potenziale fonte di prodotti naturali bioattivi [80]. Contengono composti quali steroli, terpenoidi, fenolici tobrominati, che mostrano bioattività contro i microrganismi [245]. Negli ultimi anni, numerosi composti derivati da macro alghe hanno mostrato di possedere una vasta gamma di attività biologiche come antibatterica, antifungina, antivirale, antineoplastica, antinfiammatoria, citotossica e antimitotica [246]. Attualmente le alghe costituiscono risorse marine rinnovabili commercialmente importanti che forniscono fonti preziose per lo sviluppo di nuovi farmaci contro il cancro, le infezioni microbiche e le infiammazioni [247].

I risultati della presente attività sembrano essere contrastanti con numerose evidenze scientifiche che riportano un'ampia attività antimicrobica delle specie appartenenti al genere *Gracilaria* [247–252], con gli estratti in metanolo a migliore attività. Ma, a un esame più dettagliato della bibliografia, ci si rende conto della quasi totale assenza di dati riguardanti l'attività antibiotica degli estratti di *G. gracilis*. Esistono, infatti, solo pochi studi riguardanti l'argomento. Fra questi, Cavallo et al. [253] riporta un'attività antibiotica dell'estratto in metanolo/cloroformio di *G. gracilis* solo contro *Vibrio salmonicida* e con un alone inibitorio di 8 mm, e Rizzo et al. [76] che riporta un'attività antibatterica di estratto in etanolo contro *Aeromonas hydrophila e Vibrio harveyi* di 7 mm di inibizione.

È da tenere in considerazione che, come ampiamente riportato nei precedenti OR, la stagionalità influisce enormemente sulla composizione delle alghe, per cui in base al periodo si può avere un riscontro nell'applicazione antibiotica degli estratti differente [63].

Resta certo, comunque, che i risultati del presente studio sono di grande interesse per determinare il potenziale antibiotico della *G. gracilis*; infatti, a fronte di un'attività antibatterica circoscritta alla sola specie *B. subtilis*, si ha un forte potere inibitorio della crescita di questo microorganismo con tutti gli estratti.

Il *Bacillus subtilis* è un batterio gram-positivo che può essere isolato da una miriade di ambienti -

terrestri e acquatici - facendo sembrare che questa specie sia onnipresente e ampiamente adattata a crescere in diversi contesti [254].

Sebbene non sia enumerato fra i patogeni umani *B. subtilis* è stato spesso associato a focolai di intossicazione alimentare [255]; infatti, *B. subtilis*, come altre specie del genere, quali *B. licheniformis*, *B. pumulis* e *B. megaterium*, sono in grado di produrre lecitinasi, un enzima che distrugge le membrane cellulari dei mammiferi, e una tossina extracellulare nota come subtilisina. Sebbene la subtilisina abbia una tossicità molto bassa, questo composto proteico è capace di causare reazioni allergiche in individui esposti [256]. Per cui derrate alimentari infette da *B. subtilis*, possono rappresentare rischi per i consumatori.

I risultati ottenuti nel presente studio hanno rivelato una buona attività inibitoria degli estratti di *G. gracilis* su *B. subtilis* il che potrebbe aprire la strada per l'impiego di questi nella complessazione di conservanti alimentari utili a ridurre i rischi derivanti dalla contaminazione da questo microorganismo nelle derrate alimentari [257].

Conclusioni

In conclusione, i risultati ottenuti nella presente attività sono da considerarsi un'ottima base per studi futuri.

Fra le cose più importanti da valutare sicuramente la marcata stagionalità nella composizione dell'alga che influenza il potenziale antibatterico degli estratti algali.

Ciononostante, i risultati ottenuti rivelano informazioni interessanti riguardo la possibile utilità degli estratti di *G. gracilis* nella conservazione degli alimenti.

Attività antimicrobica estratti *G.gracilis*.

Considerazioni finali

Con le crescenti pressioni sugli stock ittici naturali determinate dai fenomeni sempre più preoccupanti di sovrapesca, l'acquicoltura rappresenta il futuro della produzione di specie ittiche destinate al consumo umano.

Come abbiamo visto lungo la dissertazione della presente tesi di dottorato, questo settore presenta diversi problemi in termini di impatto ambientale, fra cui i più importanti risultano essere legati al sovraccarico di nutrienti nelle acque di scarico degli impianti.

Purtroppo però, ad oggi, non esistono realtà consolidate (almeno nell'acquicoltura italiana) che prendano in seria considerazione il problema della sostenibilità ambientale delle pratiche acquicolturali. Una presa di coscienza, però, sarà necessaria a breve, soprattutto considerando le sempre più restrittive leggi che regolano l'immissione di reflui nei compi idrici naturali.

La problematica quindi, va affrontata in maniera metodica e con soluzioni che possano rappresentare un ricavo e non un costo, in modo da invogliare gli imprenditori del campo acquicolturale a investire in tali espedienti; questi potenzialmente potrebbero contribuire a ridurre notevolmente il rischio di eutrofizzazione.

Con il presente lavoro, argomentato nei suoi quattro obiettivi realizzativi, si è voluto creare un protocollo da poter applicare e sfruttare nel contesto acquicolturale nazionale.

Infatti, nell'OR1 si è identificato l'organismo (*G. gracilis*) che potesse avere le caratteristiche di: adattabilità alla coltura in ambiente naturale e in impianto, alto valore commerciale, e buon potere "depurante".

Per cui, nell'OR2 si è stabilito quale fosse il metodo migliore per l'accrescimento di questa specie in modo da poterlo applicare e sperimentare, nell'OR3, nelle acque di scarico di un impianto di acquicoltura. Infine tramite l'OR4 si sono stabilite le ulteriori potenzialità biotecnologiche della *G. gracilis*.

Il presente studio ha dimostrato, infatti, come la *Gracilaria* sia un ottimo candidato da applicare in acquicoltura multi-trofica integrata negli impianti di acquicoltura in-shore in modo da ridurre

l'eccesso di sali nutritivi disciolti nei reflui. A favore del suo utilizzo contribuiscono una serie di motivazioni:

- Buone capacità adattative ad ambienti acquatici con parametri chimico-fisici anche instabili
- Elevato valore economico derivante dalla possibile estrazione di agar di buona qualità (OR1)
- Ottimi valori di crescita ottenuti grazie alla sperimentazione di una nuova metodologia (OR2)
- Buoni risultati nell'abbattimento dei sali nutritivi nei reflui di impianti di acquicoltura (OR3)
- Potenziale applicazioni biotecnologiche:
    - supplemento funzionale nell'alimentazione di pesci (OR4, A.4.1)
    - potenzialità antibatterica dei suoi estratti (OR4, A.4.2)

Tenuto conto delle sopraelencate caratteristiche, la *G. gracilis* costituisce un organismo che potrebbe essere abbondantemente utilizzato nell'industria acquicolturale, valorizzata non solo dai possibili effetti "salutari" ma anche da un'ottima ricaduta economica.

Visibilità del lavoro

Il progetto di dottorato ha destato inoltre l'interesse dei media ed è stato preso in considerazione in:

- Intervista per la trasmissione televisiva Linea Blu di Rai 1. Disponibile al link: http://www.lineablu.rai.it/dl/portali/site/news/ContentItem-099a4457-fe0b-4aea-9402-7726b7bc2dd0.html
- Alghe, tesoro in fondo al Lago, Articolo in Centonove, giornale regionale siciliano.
- Intervista su *Gracilaria gracilis*, presso LET'S. Disponibile al link: http://www.triwu.it/tag/gioele-capillo/
- Presentazione a congressi nazionali e internazionali (SIBS, SItE, EuroLag 8).
- Pubblicazioni su riviste internazionali (Current Organic Chemistry, Fish and Shellfish Immunology)

Bibliografia

1. FAO The state of world fisheries and aquaculture. *State World Fish. Aquac. 2016* **2016**, doi:92-5-105177-1.

2. Lund, E.K. Health benefits of seafood; Is it just the fatty acids? In *Food Chemistry*; 2013.

3. Jennings, S.; Andersen, K.H.; Blanchard, J.L. Marine Ecology and Fisheries. In *Metabolic Ecology: A Scaling Approach*; 2012 ISBN 9780470671535.

4. FAO (Food & Agriculture Organisation) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*; 2012; ISBN 9789251072257.

5. FAO *The state of world fisheries and aquaculture*; 2014; Vol. 2014; ISBN 9789251072257.

6. Fao, F. the State of World Fisheries and Aquaculture. *Aquaculture* **2010**.

7. European Environment Agency *Seafood in Europe - A food system approach for sustainability*; 2016;

8. Commission of the European Communities European governance: A white paper. *Gov. An Int. J. Policy Adm.* **2001**, doi:10.1504/IJPP.2010.032300.

9. Mwanja, W.W.; Akol, A.; Abubaker, L.; Mwanja, M.; Msuku, S.B.; Bugenyi, F. Status and impact of rural aquaculture practice on Lake Victoria basin wetlands. *Afr. J. Ecol.* **2007**, doi:10.1111/j.1365-2028.2006.00691.x.

10. Rigby, B.; Davis, R.; Bavington, D.; Baird, C. Industrial aquaculture and the politics of resignation. *Mar. Policy* **2017**, doi:10.1016/j.marpol.2016.10.016.

11. Edwards, P. Aquaculture environment interactions: Past, present and likely future trends. *Aquaculture* 2015.

12. Da Rocha, J.M.; Cerviño, S.; Villasante, S. The Common Fisheries Policy: An enforcement problem. *Mar. Policy* **2012**, doi:10.1016/j.marpol.2012.02.025.

13. Read, P.; Fernandes, T. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. In *Aquaculture*; 2003.

14. Grigorakis, K.; Rigos, G. Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 2011.

15. Natale, F.; Hofherr, J.; Fiore, G.; Virtanen, J. Interactions between aquaculture and fisheries. *Mar. Policy* **2013**, doi:10.1016/j.marpol.2012.05.037.

16. Merino, G.; Barange, M.; Mullon, C.; Rodwell, L. Impacts of global environmental change and aquaculture expansion on marine ecosystems. *Glob. Environ. Chang.* **2010**, doi:10.1016/j.gloenvcha.2010.07.008.

17. Bendiksen, E.Å.; Johnsen, C.A.; Olsen, H.J.; Jobling, M. Sustainable aquafeeds: Progress towards reduced reliance upon marine ingredients in diets for farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture* **2011**, doi:10.1016/j.aquaculture.2011.01.040.

18. Deutsch, L.; Gräslund, S.; Folke, C.; Troell, M.; Huitric, M.; Kautsky, N.; Lebel, L. Feeding aquaculture growth through globalization: Exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Glob. Environ. Chang.* **2007**, doi:10.1016/j.gloenvcha.2006.08.004.

19. Slater, M.J.; Jeffs, A.G.; Carton, A.G. The use of the waste from green-lipped mussels as a food source for juvenile sea cucumber, Australostichopus mollis. *Aquaculture* **2009**, doi:10.1016/j.aquaculture.2009.04.027.

20. Barroso, F.G.; de Haro, C.; Sánchez-Muros, M.-J.; Venegas, E.; Martínez-Sánchez, A.; Pérez-Bañón, C. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* **2014**, doi:10.1016/j.aquaculture.2013.12.024.

21. Fisheriesaquaculture, F. a O.; Paper, T. *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture*; 2009; ISBN 9789251064207.

22. Marinho-Soriano, E.; Azevedo, C.A.A.; Trigueiro, T.G.; Pereira, D.C.; Carneiro, M.A.A.; Camara, M.R. Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and Artemia. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2011**, doi:10.1016/j.ibiod.2010.10.001.

23. Zhou, Y.; Yang, H.; Hu, H.; Liu, Y.; Mao, Y.; Zhou, H.; Xu, X.; Zhang, F. Bioremediation potential of the macroalga Gracilaria lemaneiformis (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal waters of north China. *Aquaculture* **2006**, doi:10.1016/j.aquaculture.2005.06.046.

24. Páez-Osuna, F. The environmental impact of shrimp aquaculture: A global perspective. *Environ. Pollut.* **2001**, doi:10.1016/S0269-7491(00)00111-1.

25. Piedrahita, R.H. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. In *Aquaculture*; 2003.

26. Buschmann, A.H.; Hernández-González, M.C.; Aranda, C.; Chopin, T.; Neori, A.; Halling, C.; Troell, M. Mariculture Waste Management. In *Encyclopedia of Ecology*; 2008 ISBN 9780080454054.

27. Paul, B.G.; Vogl, C.R. Impacts of shrimp farming in Bangladesh: Challenges and alternatives. *Ocean Coast. Manag.* 2011.

28. Jegatheesan, V.; Shu, L.; Visvanathan, C. Aquaculture Effluent: Impacts and Remedies for Protecting the Environment and Human Health. In *Encyclopedia of environmental health*; 2011 ISBN 9780444522733 0444522735.

29. Ferreira, J.G.; Andersen, J.H.; Borja, A.; Bricker, S.B.; Camp, J.; Cardoso da Silva, M.; Garcés, E.; Heiskanen, A.S.; Humborg, C.; Ignatiades, L.; Lancelot, C.; Menesguen, A.; Tett, P.; Hoepffner, N.; Claussen, U. Overview of eutrophication indicators to assess environmental status within the European Marine Strategy Framework Directive. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **2011**, doi:10.1016/j.ecss.2011.03.014.

30. Chávez-Crooker, P.; Obreque-Contreras, J. Bioremediation of aquaculture wastes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010.

31. Avnimelech, Y. Carbonrnitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* **1999**, *176*, 227–235, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X.

32. Boyd, C.E.; Gross, A. Water use and conservation for inland aquaculture ponds. In *Fisheries Management and Ecology*; 2000.

33. Lin, C.; Zhang, L. Habitat enhancement and rehabilitation. *Dev. Aquac. Fish. Sci.* **2015**, doi:10.1016/B978-0-12-799953-1.00018-0.

34. Beveridge, M.C.M. Aquaculture and wildlife interactions. *Cah. Options Méditerranéennes* **2001**.

35. WFD Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Off. J. Eur. Parliam.* **2000**, doi:10.1039/ap9842100196.

36. Ferreira, J.G.; Vale, C.; Soares, C. V.; Salas, F.; Stacey, P.E.; Bricker, S.B.; Silva, M.C.; Marques, J.C. Monitoring of coastal and transitional waters under the E.U. water framework directive. *Environ. Monit. Assess.* **2007**, doi:10.1007/s10661-007-9643-0.

37. Directors, W.; Circa, W.F.D.; IMPRESS Guidance for the analysis of Pressures and Impacts In accordance with the Water Framework Directive. *Water Policy* 2003.

38. Burridge, L.; Weis, J.S.; Cabello, F.; Pizarro, J.; Bostick, K. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 2010.

39. Cole, D.W.; Cole, R.; Gaydos, S.J.; Gray, J.; Hyland, G.; Jacques, M.L.; Powell-Dunford, N.; Sawhney, C.; Au, W.W. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2009**, doi:10.1016/j.ijheh.2008.08.003.

40. Diana, J.S. Aquaculture Production and Biodiversity Conservation. *Bioscience* **2009**, doi:10.1525/bio.2009.59.1.7.

41. Arthur, R.I.; Lorenzen, K.; Homekingkeo, P.; Sidavong, K.; Sengvilaikham, B.; Garaway, C.J. Assessing impacts of introduced aquaculture species on native fish communities: Nile tilapia and major carps in SE Asian freshwaters. *Aquaculture* **2010**, doi:10.1016/j.aquaculture.2009.11.022.

42. Cordero, D.; Delgado, M.; Liu, B.; Ruesink, J.; Saavedra, C. Population genetics of the Manila clam (Ruditapes philippinarum) introduced in North America and Europe. *Sci. Rep.* **2017**, doi:10.1038/srep39745.

43. Scalici, M.; Chiesa, S.; Gherardi, F.; Ruffini, M.; Gibertini, G.; Marzano, F.N. The new threat to Italian inland waters from the alien crayfish "gang": The Australian Cherax destructor Clark, 1936. *Hydrobiologia* **2009**, doi:10.1007/s10750-009-9839-0.

44. Granada, L.; Sousa, N.; Lopes, S.; Lemos, M.F.L. Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges? – a review. *Rev. Aquac.* 2016.

45. Stabili, L.; Schirosi, R.; Licciano, M.; Mola, E.; Giangrande, A. Bioremediation of bacteria in aquaculture waste using the polychaete Sabella spallanzanii. *N. Biotechnol.* **2010**, doi:10.1016/j.nbt.2010.06.018.

46. Merrifield, D.L.; Bradley, G.; Harper, G.M.; Baker, R.T.M.; Munn, C.B.; Davies, S.J. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized Pediococcus acidilactici on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). *Aquac. Nutr.* **2011**, doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x.

47. Caipang, C.M.A.; Lazado, C.C. Nutritional impacts on fish mucosa: Immunostimulants, pre- and probiotics. In *Mucosal Health in Aquaculture*; 2015 ISBN 9780124171930.

48. Oliva-Teles, A. Nutrition and health of aquaculture fish. *J. Fish Dis.* 2012.

49. Pohlenz, C.; Gatlin, D.M. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture* **2014**, *431*, 111–117, doi:10.1016/j.aquaculture.2014.02.008.

50. Safari, R.; Hoseinifar, S.H.; Nejadmoghadam, S.; Jafar, A. Transciptomic study of mucosal immune, antioxidant and growth related genes and non-specific immune response of common carp (Cyprinus carpio) fed dietary Ferula (Ferula assafoetida). *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, doi:10.1016/j.fsi.2016.05.038.

51. Barrington, K.; Chopin, T.; Robinson, S. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. *Integr. Maric. - A Glob. Rev. - FAO Fish. Aquac. Tech. Pap. N0. 529* **2009**, doi:10.1016/S0044-8486(03)00469-1.

52. Troell, M.; Joyce, A.; Chopin, T.; Neori, A.; Buschmann, A.H.; Fang, J.G. Ecological engineering in aquaculture - Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture* 2009.

53. Araújo, M.; Rema, P.; Sousa-Pinto, I.; Cunha, L.M.; Peixoto, M.J.; Pires, M.A.; Seixas, F.; Brotas, V.; Beltrán, C.; Valente, L.M.P. Dietary inclusion of IMTA-cultivated Gracilaria vermiculophylla in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) diets: effects on growth, intestinal morphology, tissue pigmentation, and immunological response. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 679–689, doi:10.1007/s10811-015-0591-8.

54. Polifrone, M.; De Masi, F.; Gargiulo, G.M. Alternative pathways in the life history of Gracilaria gracilis (Gracilariales, Rhodophyta) from north-eastern Sicily (Italy). *Aquaculture* **2006**, doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.026.

55. Monteleone, A.; Capillo, G.; Sanfilippo, M.; Manganaro, A. Effects of temperature on the density of Gracilaria gracilis in the salted pond of Ganzirri (NE Sicily): Global changes? In *2nd Young Natural Scientists' Meeting, Parigi*; 2015.

56. Marinho-Soriano, E.; Bourret, E. Effects of season on the yield and quality of agar from Gracilaria species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresour. Technol.* **2003**, doi:10.1016/S0960-8524(03)00112-3.

57. Gargiulo, G.M.; Morabito, M.; Genovese, G.; Masi, F. De Molecular systematics and phylogenetics of Gracilariacean species from the Mediterranean sea. *J. Appl. Phycol.* **2006**, doi:10.1007/s10811-006-9055-5.

58. Buschmann, A.H.; Westermeier, R.; Retamales, C.A. Cultivation of Gracilaria on the sea-bottom in southern Chile: a review. *J. Appl. Phycol.* **1995**, doi:10.1007/BF00004003.

59. Buschmann, A.H.; Correa, J.A.; Westermeier, R.; Hernández-González, M. del C.; Norambuena, R. Red algal farming in Chile: A review. *Aquaculture* 2001.

60. Capillo, G.; Sanfilippo, M.; Aliko, V.; Spano, N.; Spinelli, A.; Manganaro, A. Gracilaria gracilis, Source of Agar: A Short Review. *Curr. Org. Chem.* **2017**, *21*, 380–386, doi:10.2174/1385272820666161017164605.

61. Marinho-Soriano, E. Agar polysaccharides from Gracilaria species (Rhodophyta, Gracilariaceae). *J. Biotechnol.* **2001**, doi:10.1016/S0168-1656(01)00255-3.

62. Mollet, J.C.; Rahaoui, A.; Lemoine, Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of Gracilaria gracilis, Gracilariopsis longissima and the newly reported Gracilaria cf. vermiculophylla from Roscoff (Brittany, France). *J. Appl. Phycol.* **1998**, doi:10.1023/A:1008051528443.

63. Francavilla, M.; Franchi, M.; Monteleone, M.; Caroppo, C. The red seaweed gracilaria gracilis as a multi products source. *Mar. Drugs* **2013**, doi:10.3390/md11103754.

64. Guiry, M.D.; Guiry, G.M. Algae Base Available online: http://www.algaebase.org.

65. Hughes, J.S.; Otto, S.P. Ecology and the evolution of biphasic life cycles. *Am. Nat.* **1999**, doi:10.1086/303241.

66. Engel, S.; Jensen, P.R.; Fenical, W. Chemical ecology of marine microbial defense. *J. Chem. Ecol.* **2002**, doi:10.1023/A:1020793726898.

67. Engel, C.R.; Destombe, C. Reproductive ecology of an intertidal red seaweed, Gracilaria gracilis: Influence of high and low tides on fertilization success. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* **2002**, doi:10.1017/S0025315402005349.

68. Martín, L.A.; de Zaixso, A.L.B.; Leonardi, P.I. Biomass variation and reproductive phenology of Gracilaria gracilis in a Patagonian natural bed (Chubut, Argentina). *J. Appl. Phycol.* **2011**, doi:10.1007/s10811-010-9555-1.

69. Abbruzzese, D.; Genovese, S. Osservazioni geomorfologiche e fisico chimiche sui laghi di Ganzirri e FaroNo Title. *Boll. Pesca, Piscic., Idrob.* **1972**, 3–20.

70. Berdar, G.; Riccobono, F. *Le meraviglie dello Stretto di Messina*; Ed. Dr. Antonino Sfameni,

E., Ed.; Messina, 1986;

71. Maurolico, F. *Tractatus per epistolam Francisci Maurolici ad Petrum Gillium: De piscibus siculis.*; 1543;

72. Mazzarelli, G. L'origine marina dei laghi di Faro e Ganzirri. *Boll. Pesca, Piscic., Idrob.* **1938**, *14*, 31–40.

73. Cavaliere, A. Fauna e flora dei laghi di Faro e Ganzirri (Messina), nota I, i teleostei del lago di Faro. *Bolletino di Pesca, Piscic. e Idrobiol. del lago di Faro* **1967**, *22*, 83–102.

74. Saunders, G.W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: A preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2005**, doi:10.1098/rstb.2005.1719.

75. Stern, R.F.; Horak, A.; Andrew, R.L.; Coffroth, M.A.; Andersen, R.A.; Küpper, F.C.; Jameson, I.; Hoppenrath, M.; Véron, B.; Kasai, F.; Brand, J.; James, E.R.; Keeling, P.J. Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments. *PLoS One* **2010**, doi:10.1371/journal.pone.0013991.

76. Rizzo, C.; Genovese, G.; Morabito, M.; Faggio, C.; Pagano, M.; Spanò, A.; Zammuto, V.; Minicante, S.A.; Manghisi, A.; Cigala, R.M.; Crea, F.; Marino, F.; Gugliandolo, C. Potential antibacterial activity of marine macroalgae against pathogens relevant for aquaculture and human health. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2017**, doi:10.22207/JPAM.11.4.07.

77. Bezerra, A.F.; Marinho-Soriano, E. Cultivation of the red seaweed Gracilaria birdiae (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass and Bioenergy* **2010**, doi:10.1016/j.biombioe.2010.07.016.

78. de Almeida, C.L.F.; Falcão, H. de S.; Lima, G.R. d. M.; Montenegro, C. de A.; Lira, N.S.; de Athayde-Filho, P.F.; Rodrigues, L.C.; de Souza, M.F. V.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Bioactivities from marine algae of the genus Gracilaria. *Int. J. Mol. Sci.* 2011.

79. Alveal, K.; Romo, H.; Werlinger, C.; Oliveira, E.C. Mass cultivation of the agar-producing alga Gracilaria chilensis (Rhodophyta) from spores. *Aquaculture* **1997**, doi:10.1016/S0044-8486(96)01415-9.

80. McHugh, D.J. *A Guide to the Seaweed Industry*; 2003; ISBN 92-5-104958-0.

81. FAO *The State of Food and Agriculture 2012*; 2013; ISBN 9789251073179.

82. Jayasankar, R.; Varghese, S. Cultivation of marine red alga Gracilaria edulis (Gigartinales, Rhodophyta) from spores. *Indian J. Mar. Sci.* **2002**.

83. Santelices, B.; Ojeda, F.P. Recruitment, growth and survival of Lessonia nigrescens (Phaerophytra)at various tidal levels in exposed habitats of central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1984**, doi:10.3354/meps019073.

84. Dural, B.; Demir, N.; Sunlu, U. A pilot-scale unit for suspended cultivation of Gracilaria gracilis in Izmir Bay, Aegean Sea-Turkey. *Pakistan J. Biol. Sci.* **2006**, doi:10.3923/pjbs.2006.1043.1046.

85. Ganesan, M.; Sahu, N.; Eswaran, K. Raft culture of Gracilaria edulis in open sea along the south-eastern coast of India. *Aquaculture* **2011**, doi:10.1016/j.aquaculture.2011.08.040.

86. Sanfilippo, M.; Manganaro, A.; Messina, C.; Renda, G.; SANTULLI, A. Preliminary investigations on Gracilaria gracilis cultivation techniques and extraction of bioactive compounds with antioxidant activity. In *SIBS - Palermo, 24-25 Ottobre 2013.*; 2013; pp. 165–166.

87. Peng, C.; Hong-BO, S.; Di, X.; Song, Q. Progress in *Gracilaria* Biology and Developmental Utilization: Main Issues and Prospective. *Rev. Fish. Sci.* **2009**, doi:10.1080/10641260903144586.

88. Dawes, C.P. Suspended cultivation of Gracilaria in the sea. *J. Appl. Phycol.* **1995**, doi:10.1007/BF00004004.

89. Armisen, R. World-wide use and importance of Gracilaria. *J. Appl. Phycol.* **1995**, doi:10.1007/BF00003998.

90. Galatas, F.; Armisen, R. Chapter 1 - Production, Properties and Uses of Agar Available online: http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e03.htm%0Ahttp://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e03.htm#chapter 1 production, properties and uses of agar.

91. Lüning, K.; Pang, S. Mass Cultivation of Seaweed: Current Aspects and Approaches. *J. Appl. Phycol.* **2003**, doi:10.1023/A:1023807503255.

92. Tseng, C.K. Algal biotechnology industries and research activities in China. In *Journal of Applied Phycology*; 2001.

93. Bourgougnon, N.; Stiger-Pouvreau, V. Chemodiversity and Bioactivity within Red and

Brown Macroalgae Along the French coasts, Metropole and Overseas Departements and Territories. In *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*; 2011 ISBN 9780470979181.

94. Kain, J.M.; Destombe, C. A review of the life-history, reproduction and phenology of gracilaria. *J. Appl. Phycol.* **1995**, doi:10.1007/BF00004001.

95. Lee, W.K.; Lim, P.E.; Phang, S.M.; Namasivayam, P.; Ho, C.L. Agar properties of Gracilaria species (Gracilariaceae, Rhodophyta) collected from different natural habitats in Malaysia. *Reg. Stud. Mar. Sci.* **2016**, doi:10.1016/j.rsma.2016.06.001.

96. Capillo, G.; Sanfilippo, M.; Li Volsi, R.; Spinelli, A.; Panarello, G.; Spanò, N. Gracilaria gracilis (gracilariales, rhodotphyta) from Ganzirri lagoon, state of art and perspectives. In *XIII INCONTRO DEI DOTTORANDI IN ECOLOGIA E SCIENZE DEI SISTEMI ACQUATICI. Palermo*; 2017.

97. Santos, G.A.; Doty, M.S. Agar from some Hawaiian red algae. *Aquat. Bot.* **1983**, doi:10.1016/0304-3770(83)90084-0.

98. Rees, D.A. Structure, Conformation, and Mechanism in the Formation of Polysaccharide Gels and Networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1970**, doi:10.1016/S0065-2318(08)60352-2.

99. Duckworth, M.; Yaphe, W. The structure of agar. *Carbohydr. Res.* **1971**, doi:10.1016/S0008-6215(00)86113-3.

100. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Compendium of Food Additive Specifications. *FAO JECFA Monogr.* **2014**.

101. Wijesekara, I.; Pangestuti, R.; Kim, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 2011.

102. Rioux, L.E.; Turgeon, S.L. Seaweed carbohydrates. In *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*; 2015 ISBN 9780124199583.

103. Cardoso, S.; Carvalho, L.; Silva, P.; Rodrigues, M.; Pereira, O.; Pereira, L. Bioproducts from Seaweeds: A Review with Special Focus on the Iberian Peninsula. *Curr. Org. Chem.* **2014**, doi:10.2174/1385272818071405151541 16.

104. Pereira, L. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In *Seaweed*; 2011 ISBN 0250-832X (Print)n0250-832X (Linking).

105. Matanjun, P.; Mohamed, S.; Mustapha, N.M.; Muhammad, K. Nutrient content of tropical edible seaweeds, Eucheuma cottonii, Caulerpa lentillifera and Sargassum polycystum. *J. Appl. Phycol.* **2009**, doi:10.1007/s10811-008-9326-4.

106. Rossi, F.; Santoro, M.; Casalini, T.; Veglianese, P.; Masi, M.; Perale, G. Characterization and degradation behavior of agar-carbomer based hydrogels for drug delivery applications: Solute effect. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, doi:10.3390/ijms12063394.

107. García-González, C.A.; Alnaief, M.; Smirnova, I. Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydr. Polym.* **2011**, doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.066.

108. De Maio, A.; Moretti, M.; Sansone, E.; Bregant, D. *Idrologia del Canale di Sicilia, Nave Dectra, ottobre 1969. Volume di Studi in onore di G. Aliverti*; Napoli, 1972;

109. Alnaief, M.; Smirnova, I. In situ production of spherical aerogel microparticles. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, doi:10.1016/j.supflu.2010.10.006.

110. Hoare, T.R.; Kohane, D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf).* 2008.

111. Wang, L.F.; Rhim, J.W. Preparation and application of agar/alginate/collagen ternary blend functional food packaging films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.07.007.

112. Zemke-White, W.L.; Ohno, M. World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.* **1999**, doi:10.1023/A:1008197610793.

113. Smit, A.J.; Bolton, J.J. Organismic determinants and their effect on growth and regeneration in Gracilaria gracilis. *J. Appl. Phycol.* **1999**, doi:10.1023/A:1008102409472.

114. Lee, W.-K.; Lim, Y.-Y.; Leow, A.T.-C.; Namasivayam, P.; Ong Abdullah, J.; Ho, C.-L. Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym.* **2017**, doi:10.1016/j.carbpol.2017.01.078.

115. Bixler, H.J.; Porse, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J. Appl. Phycol.* **2011**, doi:10.1007/s10811-010-9529-3.

116. Manganaro, A.; Pulicanò, G.; Reale, A.; Sanfilippo, M.; Sarà, G. Filtration pressure by bivalves affects the trophic conditions in Mediterranean shallow ecosystems. *Chem. Ecol.* **2009**, doi:10.1080/02757540903325120.

117. Spinelli, A.; Capillo, G.; Faggio, C.; Viatale, D.; Spanò, N. Returning of Hippocampus hippocampus (Linnaeus, 1758) (Syngnathidae) in the Faro Lake – Oriented Natural Reserve of Capo Peloro, Italy. *Nat. Prod. Res.* **2018**, doi:10.1080/14786419.2018.1490909.

118. Manganaro, A.; Pulicanò, G.; Sanfilippo, M. Temporal evolution of the area of Capo Peloro (Sicily, Italy) from pristine site into urbanized area. *Transitional Waters Bull.* **2011**, doi:10.1285/i1825229Xv5n1p23.

119. Vanucci, S.; Bruni, V.; Pulicanò, G. Spatial and temporal distribution of virioplankton and bacterioplankton in a Brackish Environment (Lake of Ganzirri, Italy). *Hydrobiologia* **2005**, doi:10.1007/s10750-004-3368-7.

120. Ferrarin, C.; Bergamasco, A.; Umgiesser, G.; Cucco, A. Hydrodynamics and spatial zonation of the Capo Peloro coastal system (Sicily) through 3-D numerical modeling. *J. Mar. Syst.* **2013**, doi:10.1016/j.jmarsys.2013.02.005.

121. Sanfilippo, M.; Capillo, G.; Spanò, N.; Manganaro, A. Evaluation of Water Variables in No-Take Zone of Ustica Marine Protected Area (Southern Tyrrhenian Sea). **2016**, *59*, 1–10.

122. Eugene W. Rice, Rodger B. Baird, Andrew D. Eaton, L.S.C. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Am. Water Work. Assoc. Public Work. Assoc. Environ. Fed.* **2012**.

123. Santelices, B.; Doty, M.S. A review of Gracilaria farming. *Aquaculture* 1989.

124. Skriptsova, A. V.; Nabivailo, Y. V. Comparison of three gracilarioids: Growth rate, agar content and quality. *J. Appl. Phycol.* **2009**, doi:10.1007/s10811-008-9389-2.

125. Skriptsova, A. V.; Nabivailo, Y. V. Comparison of three gracilarioids : Growth rate , agar content and quality Comparison of three gracilarioids : growth rate , agar content and quality. *J. Appl. Phycol.* **2009**, doi:10.1007/s10811-008-9389-2.

126. Gargiulo, G.M.; De Masi, F.; Tripodi, G. Morphology, reproduction and taxonomy of the Mediterranean species of Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycologia* **1992**, doi:10.2216/i0031-8884-31-1-53.1.

127. Kaliaperumal, N.; Kalimuthu, S. Seaweed potential and its exploitation in india. *Seaweed Res. Utiln.* **1997**.

128. Namperumalsamy, P.; Kim, R.; Kaliaperumal, K.; Sekar, A.; Karthika, A.; Nirmalan, P.K.

A pilot study on awareness of diabetic retinopathy among non-medical persons in South India. The challenge for eye care programmes in the region. *Indian J. Ophthalmol.* **2004**.

129. Subbaramaiah, K.; Thomas, P.C. Raft cultivation of Gracilaria edulis (Gmel.) Silva. *Proc. Plant Sci.* **1990**, doi:10.1007/BF03053436.

130. Rao, M.U. Growth and reproduction in some species of Gracilaria and Gracilariopsis in the Palk bay. *Indian J. Fish.* **1973**.

131. Capillo, G.; Silvestro, S.; Sanfilippo, M.; Fiorino, E.; Giangrosso, G.; Ferrantelli, V.; Vazzana, I.; Faggio, C. Assessment of Electrolytes and Metals Profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and Its Impact on Mytilus galloprovincialis. *Chem. Biodivers.* 2018.

132. Nabivailo, Y. V.; Skriptsova, A. V.; Titlyanov, E.A. Interactions of algae within the community of Gracilaria gracilis (Rhodophyta). *Russ. J. Mar. Biol.* **2005**, doi:10.1007/s11179-005-0090-x.

133. FAO The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. *Food Agric. Oraganization United Nations* **2014**, doi:92-5-105177-1.

134. Grote, B. Bioremediation of aquaculture wastewater: evaluating the prospects of the red alga Palmaria palmata (Rhodophyta) for nitrogen uptake. *J. Appl. Phycol.* **2016**, doi:10.1007/s10811-016-0848-x.

135. Hadley, S.; Wild-Allen, K.; Johnson, C.; Macleod, C. Quantification of the impacts of finfish aquaculture and bioremediation capacity of integrated multi-trophic aquaculture using a 3D estuary model. *J. Appl. Phycol.* **2016**, doi:10.1007/s10811-015-0714-2.

136. Bonsdorff, E.; Blomqvist, E.M.; Mattila, J.; Norkko, A. Coastal eutrophication: Causes, consequences and perspectives in the Archipelago areas of the northern Baltic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **1997**, doi:10.1016/S0272-7714(97)80008-X.

137. Buschmann, A.H.; Cabello, F.; Young, K.; Carvajal, J.; Varela, D.A.; Henríquez, L. Salmon aquaculture and coastal ecosystem health in Chile: Analysis of regulations, environmental impacts and bioremediation systems. *Ocean Coast. Manag.* 2009.

138. Carmona, R.; Kraemer, G.P.; Yarish, C. Exploring Northeast American and Asian species of Porphyra for use in an integrated finfish-algal aquaculture system. *Aquaculture* **2006**, doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.049.

139. Bolton, J.J.; Robertson-Andersson, D. V.; Shuuluka, D.; Kandjengo, L. Growing ulva (chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South africa: A swot analysis. *J. Appl. Phycol.* **2009**, doi:10.1007/s10811-008-9385-6.

140. Chopin, T.; Cooper, J.A.; Reid, G.; Cross, S.; Moore, C. Open-water integrated multi-trophic aquaculture: Environmental biomitigation and economic diversification of fed aquaculture by extractive aquaculture. *Rev. Aquac.* **2012**, doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01074.x.

141. Neori, A.; Nobre, A.M. Relationship between Trophic level and economics in aquaculture. *Aquac. Econ. Manag.* **2012**, doi:10.1080/13657305.2012.649046.

142. Neori, A.; Chopin, T.; Troell, M.; Buschmann, A.H.; Kraemer, G.P.; Halling, C.; Shpigel, M.; Yarish, C. Integrated aquaculture: Rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture* 2004.

143. INNOVAQUA Innovazione Tecnologica a Supporto dell'incremento della Produttività e della Competitività dell'acquacoltura Siciliana Codice progetto: PON02_00451_3362185.

144. Hurd, C.L.; Harrison, P.J.; Bischof, K.; Lobban, C.S. *Seaweed ecology and physiology, second edition*; 2014; ISBN 9781139192637.

145. Harrison, P.J.; Hurd, C.L. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cah. Biol. Mar.* **2001**.

146. Troell, M.; Halling, C.; Nilsson, A.; Buschmann, A.H.; Kautsky, N.; Kautsky, L. Integrated marine cultivation of Gracilaria chilensis (Gracilariales, Rhodophyta) and salmon cages for reduced environmental impact and increased economic output. *Aquaculture* **1997**, doi:10.1016/S0044-8486(97)00080-X.

147. Hernández, I.; Pérez-Pastor, A.; Vergara, J.J.; Martínez-Aragón, J.F.; Fernández-Engo, M.Á.; Pérez-Lloréns, J.L. Studies on the biofiltration capacity of Gracilariopsis longissima: From microscale to macroscale. *Aquaculture* **2006**, doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.048.

148. Huo, Y.Z.; Xu, S.N.; Wang, Y.Y.; Zhang, J.H.; Zhang, Y.J.; Wu, W.N.; Chen, Y.Q.; He, P.M. Bioremediation efficiencies of Gracilaria verrucosa cultivated in an enclosed sea area of Hangzhou Bay, China. *J. Appl. Phycol.* **2011**, doi:10.1007/s10811-010-9584-9.

149. Jones, A.B.; Dennison, W.C.; Preston, N.P. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: A laboratory scale study.

Aquaculture **2001**, doi:10.1016/S0044-8486(00)00486-5.

150. Mao, Y.; Yang, H.; Zhou, Y.; Ye, N.; Fang, J. Potential of the seaweed Gracilaria lemaneiformis for integrated multi-trophic aquaculture with scallop Chlamys farreri in North China. *J. Appl. Phycol.* **2009**, doi:10.1007/s10811-008-9398-1.

151. Neori, A.; L.c. Ragg, N.; Shpigel, M. The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (Haliotis tuberculata) and macroalgae culture system. *Aquac. Eng.* **1998**, doi:10.1016/S0144-8609(98)00017-X.

152. Huo, Y.; Wu, H.; Chai, Z.; Xu, S.; Han, F.; Dong, L.; He, P. Bioremediation efficiency of Gracilaria verrucosa for an integrated multi-trophic aquaculture system with Pseudosciaena crocea in Xiangshan harbor, China. *Aquaculture* **2012**, doi:10.1016/j.aquaculture.2011.11.002.

153. Martínez-Aragón, J.F.; Hernández, I.; Pérez-Lloréns, J.L.; Vázquez, R.; Vergara, J.J. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by three species of estuarine macroalgae cultivated with sea bass (Dicentrarchus labrax) waste waters 1. Phosphate. *J. Appl. Phycol.* **2002**, doi:10.1023/A:1022134701273.

154. Hernandez, I.; Martinez-Aragon, J.F.; Tovar, a; Terez-Llorens, J.L.; Vergara, J.J. Biofiltering efficiency in removal of dissolved nutrients by the three species of estuarine macroalgae with sea bass (Dicentrarchus labrax) wate waters 2. Ammonium. *Jounal Appl. Phycol.* **2002**, *14*, 375–384.

155. Mehta, S.K.; Gaur, J.P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2005.

156. Hannachia, Y.; Dekhila, A.B.; Boubakera, T. Biosorption potential of the red alga, Gracilaria verrucosa for the removal of Zn 2+ ions from aqueous media: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. **2013**.

157. Jacinto, J.; Henriques, B.; Duarte, A.C.; Vale, C.; Pereira, E. Removal and recovery of Critical Rare Elements from contaminated waters by living Gracilaria gracilis. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *344*, 531–538, doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.054.

158. Hoseinifar, S.H.; Safari, R.; Dadar, M. Dietary sodium propionate affects mucosal immune parameters, growth and appetite related genes expression: Insights from zebrafish model. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2017**, doi:10.1016/j.ygcen.2016.11.008.

159. Safari, R.; Hoseinifar, S.H.; Kavandi, M. Modulation of antioxidant defense and immune response in zebra fish (Danio rerio) using dietary sodium propionate. *Fish Physiol. Biochem.* **2016**, doi:10.1007/s10695-016-0253-z.

160. Guardiola, F.A.; Porcino, C.; Cerezuela, R.; Cuesta, A.; Faggio, C.; Esteban, M.A. Impact of date palm fruits extracts and probiotic enriched diet on antioxidant status, innate immune response and immune-related gene expression of European seabass (Dicentrarchus labrax). *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *52*, 298–308, doi:10.1016/j.fsi.2016.03.152.

161. Burgos-Aceves, M.A.; Cohen, A.; Paolella, G.; Lepretti, M.; Smith, Y.; Faggio, C.; Lionetti, L. Modulation of mitochondrial functions by xenobiotic-induced microRNA: From environmental sentinel organisms to mammals. *Sci. Total Environ.* **2018**, *645*, 79–88, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.109.

162. Aliko, V.; Qirjo, M.; Sula, E.; Morina, V.; Faggio, C. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, Carassius auratus, after acute manganese treatment. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *76*, 101–109, doi:10.1016/j.fsi.2018.02.042.

163. Carbone, D.; Faggio, C. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of Sparus aurata and Dicentrarchus labrax. *Fish Shellfish Immunol.* 2016, *54*, 172–178.

164. Costa, R.; Albergamo, A.; Piparo, M.; Zaccone, G.; Capillo, G.; Manganaro, A.; Dugo, P.; Mondello, L. Multidimensional gas chromatographic techniques applied to the analysis of lipids from wild-caught and farmed marine species. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2016**, doi:10.1002/ejlt.201600043.

165. Gobi, N.; Vaseeharan, B.; Rekha, R.; Vijayakumar, S.; Faggio, C. Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in Oreochromis mossambicus. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *162*, 147–159, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.06.070.

166. Van Doan, H.; Hoseinifar, S.H.; Faggio, C.; Chitmanat, C.; Mai, N.T.; Jaturasitha, S.; Ringø, E. Effects of corncob derived xylooligosaccharide on innate immune response, disease resistance, and growth performance in Nile tilapia (Oreochromis niloticus) fingerlings. *Aquaculture* **2018**, *495*, 786–793, doi:10.1016/j.aquaculture.2018.06.068.

167. Anjugam, M.; Vaseeharan, B.; Iswarya, A.; Gobi, N.; Divya, M.; Thangaraj, M.P.; Elumalai, P. Effect of β-1, 3 glucan binding protein based zinc oxide nanoparticles supplemented diet on immune response and disease resistance in Oreochromis mossambicus against Aeromonas hydrophila. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *76*, 247–259, doi:10.1016/j.fsi.2018.03.012.

168. Faggio, C.; Piccione, G.; Marafioti, S.; Arfuso, F.; Trischitta, F.; Fortino, G.; Fazio, F. Monthly variations of haematological parameters of Sparus aurata and Dicentrarchus labrax reared in Mediterranean land off-shore tanks. *Cah. Biol. Mar.* **2014**, *55*, 437–443.

169. Lauriano, E.R.; Faggio, C.; Capillo, G.; Spanò, N.; Kuciel, M.; Aragona, M.; Pergolizzi, S. Immunohistochemical characterization of epidermal dendritic-like cells in giant mudskipper, Periophthalmodon schlosseri. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *74*, doi:10.1016/j.fsi.2018.01.014.

170. Burgos-Aceves, M.A.; Cohen, A.; Smith, Y.; Faggio, C. Estrogen regulation of gene expression in the teleost fish immune system. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, *58*, 42–49, doi:10.1016/j.fsi.2016.09.006.

171. Burgos-Aceves, M.A.; Cohen, A.; Smith, Y.; Faggio, C. MicroRNAs and their role on fish oxidative stress during xenobiotic environmental exposures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018, *148*, 995–1000.

172. Reda, R.M.; Mahmoud, R.; Selim, K.M.; El-Araby, I.E. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, Oreochromis niloticus. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, doi:10.1016/j.fsi.2016.01.040.

173. Xu, S.; Zhang, L.; Wu, Q.; Liu, X.; Wang, S.; You, C.; Li, Y. Evaluation of dried seaweed Gracilaria lemaneiformis as an ingredient in diets for teleost fish Siganus canaliculatus. *Aquac. Int.* **2011**, doi:10.1007/s10499-011-9418-z.

174. Xuan, X.; Wen, X.; Li, S.; Zhu, D.; Li, Y. Potential use of macro-algae Gracilaria lemaneiformis in diets for the black sea bream, Acanthopagrus schlegelii, juvenile. *Aquaculture* **2013**, doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.022.

175. Younis, E.-S.M.; Al-Quffail, A.S.; Al-Asgah, N.A.; Abdel-Warith, A.-W.A.; Al-Hafedh, Y.S. Effect of dietary fish meal replacement by red algae, Gracilaria arcuata , on growth performance and body composition of Nile tilapia Oreochromis niloticus. *Saudi J. Biol. Sci.* **2017**, doi:10.1016/j.sjbs.2017.06.012.

176. Trichet, V.V. Nutrition and immunity: An update. *Aquac. Res.* **2010**, doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02374.x.

177. Genovese, G.; Faggio, C.; Gugliandolo, C.; Torre, A.; Spanò, A.; Morabito, M.; Maugeri, T.L. Invitro evaluation of antibacterial activity of Asparagopsis taxiformis from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Mar. Environ. Res.* **2012**, doi:10.1016/j.marenvres.2011.10.002.

178. Faggio, C.; Pagano, M.; Dottore, A.; Genovese, G.; Morabito, M. Evaluation of anticoagulant activity of two algal polysaccharides. *Nat. Prod. Res.* **2016**, doi:10.1080/14786419.2015.1086347.

179. Dawczynski, C.; Schubert, R.; Jahreis, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* **2007**, doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.041.

180. MacArtain, P.; Gill, C.I.R.; Brooks, M.; Campbell, R.; Rowland, I.R. Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr. Rev.* 2007.

181. Thanigaivel, S.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A.; John Thomas Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 2016.

182. Thanigaivel, S.; Vidhya Hindu, S.; Vijayakumar, S.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N.; Thomas, J. Differential solvent extraction of two seaweeds and their efficacy in controlling Aeromonas salmonicida infection in Oreochromis mossambicus: A novel therapeutic approach. *Aquaculture* **2015**, doi:10.1016/j.aquaculture.2015.03.010.

183. Peixoto, M.J.; Salas-Leitón, E.; Pereira, L.F.; Queiroz, A.; Magalhães, F.; Pereira, R.; Abreu, H.; Reis, P.A.; Gonçalves, J.F.M.; Ozório, R.O.D.A. Role of dietary seaweed supplementation on growth performance, digestive capacity and immune and stress responsiveness in European seabass (Dicentrarchus labrax). *Aquac. Reports* **2016**, doi:10.1016/j.aqrep.2016.03.005.

184. Gioele, C.; Marilena, S.; Valbona, A.; Nunziacarla, S.; Andrea, S.; Antonio, M. Gracilaria gracilis, source of Agar: A short review. *Curr. Org. Chem.* **2017**, *21*, doi:10.2174/1385272820666161017164605.

185. Montalbano, G.; Capillo, G.; Laurà, R.; Abbate, F.; Levanti, M.; Guerrera, M.C.; Ciriaco, E.; Germanà, A. Neuromast hair cells retain the capacity of regeneration during heavy metal exposure. *Ann. Anat.* **2018**, *218*, doi:10.1016/j.aanat.2018.03.007.

186. Licata, P.; Tardugno, R.; Pergolizzi, S.; Capillo, G.; Aragona, M.; Colombo, A.; Gervasi, T.; Pellizzeri, V.; Cicero, N.; Calò, M. In vivo effects of PCB-126 and genistein on vitellogenin expression in zebrafish. *Nat. Prod. Res.* **2018**, doi:10.1080/14786419.2018.1455048.

187. Montalbano, G.; Abbate, M.M.F.; Guerrera, M.N.M.C.; Vega, R.L.J.A. Melatonin treatment suppresses appetite genes and improves adipose tissue plasticity in diet-induced obese zebra fi sh. *Endocrine* **2018**, doi:10.1007/s12020-018-1653-x.

188. Bottari, A.; Bottari, C.; Carveni, P.; Giacobbe, S.; Spanò, N. Genesis and geomorphologic and ecological evolution of the Ganzirri salt marsh (Messina, Italy). *Quat. Int.* **2005**, *140–141*, 150–158, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2005.07.001.

189. Capillo, G.; Silvestro, S.; Sanfilippo, M.; Fiorino, E.; Giangrosso, G.; Ferrantelli, V.; Vazzana, I.; Faggio, C. Assessment of electrolytes and metals profile of the Faro Lake (Capo Peloro Lagoon, Sicily, Italy) and its impact on Mytilus galloprovincialis. *Chem. Biodivers.* **2018**, doi:10.1002/cbdv.201800044.

190. Spinelli, A.; Capillo, G.; Faggio, C.; Viatale, D.; Spanò, N. Returning of Hippocampus hippocampus (Linnaeus, 1758) (Syngnathidae) in the Faro Lake – Oriented Natural Reserve of Capo Peloro, Italy. *Nat. Prod. Res.* **2018**, doi:10.1080/14786419.2018.1490909.

191. Siccardi Iii, A.J.; Garris, H.W.; Jones, W.T.; Moseley, D.B.; D 'abramo, L.R.; Watts, S.A. Growth and Survival of Zebrafish (Danio rerio) Fed Different Commercial and Laboratory Diets. *Zebrafish* **2009**, doi:10.1089=zeb.2008.0553 Fish.

192. Goodwin, N.; Karp, N.A.; Blackledge, S.; Clark, B.; Keeble, R.; Kovacs, C.; Murray, K.N.; Price, M.; Thompson, P.; Bussell, J. Standardized Welfare Terms for the Zebrafish Community. *Zebrafish* **2016**, doi:10.1089/zeb.2016.1248.

193. Holbech, H.; Andersen, L.; Petersen, G.I.; Korsgaard, B.; Pedersen, K.L.; Bjerregaard, P. Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2001**, doi:10.1016/S1532-0456(01)00229-0.

194. Yousefi, S.; Hoseinifar, S.H.; Paknejad, H.; Hajimoradloo, A. The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (Danio rerio). *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, *73*, 192–196, doi:10.1016/j.fsi.2017.12.022.

195. Hoseinifar, S.H.; Zoheiri, F.; Caipang, C.M. Dietary sodium propionate improved performance, mucosal and humoral immune responses in Caspian white fish (Rutilus frisii kutum) fry. *Fish Shellfish Immunol.* **2016**, doi:10.1016/j.fsi.2016.06.027.

196. Hoseinifar, S.H.; Ahmadi, A.; Raeisi, M.; Hoseini, S.M.; Khalili, M.; Behnampour, N. Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (Cyprinus carpio). *Aquac. Res.* **2017**, doi:10.1111/are.13156.

197. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.

198. Merrifield, D.L.; Bradley, G.; Harper, G.M.; Baker, R.T.M.; Munn, C.B.; Davies, S.J. Assessment of the effects of vegetative and lyophilized Pediococcus acidilactici on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). *Aquac. Nutr.* **2011**, *17*, 73–79, doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x.

199. Caipang, C.M.A.; Lazado, C.C. Nutritional impacts on fish mucosa: Immunostimulants, pre- and probiotics. In *Mucosal Health in Aquaculture*; 2015; pp. 211–272 ISBN 9780124171930.

200. Pohlenz, C.; Gatlin, D.M. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture* **2014**, doi:10.1016/j.aquaculture.2014.02.008.

201. Tabrez, S.; Ahmad, M. Effect of wastewater intake on antioxidant and marker enzymes of tissue damage in rat tissues: Implications for the use of biochemical markers. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, doi:10.1016/j.fct.2009.07.004.

202. Bernal, J.; Mendiola, J.A.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. Advanced analysis of nutraceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011.

203. Onofrejová, L.; Vašíčková, J.; Klejdus, B.; Stratil, P.; Mišurcová, L.; Kráčmar, S.; Kopecký, J.; Vacek, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, doi:10.1016/j.jpba.2009.03.027.

204. Zou, J.; Secombes, C. The Function of Fish Cytokines. *Biology (Basel).* **2016**, *5*, 23, doi:10.3390/biology5020023.

205. Bird, S.; Zou, J.; Wang, T.; Munday, B.; Cunningham, C.; Secombes, C.J. Evolution of interleukin-1β. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002, *13*, 483–502.

206. Ángeles Esteban, M. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunol.* **2012**, doi:10.5402/2012/853470.

207. Shephard, K.L. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.* 1994.

208. Shephard, K.L. Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1993.

209. Dawood, M.A.O.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; El Basuini, M.F.; Hossain, M.S.; Nhu, T.H.; Moss, A.S.; Dossou, S.; Wei, H. Dietary supplementation of beta-glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, Pagrus major. *Aquac. Nutr.* **2017**, *23*, 148–159, doi:10.1111/anu.12376.

210. Zaccone, G.; Fudge, D.S.; Winegard, T.M.; Capillo, G.; Kuciel, M.; Funakoshi, K.; Lauriano, E.R. Confocal imaging and phylogenetic considerations of the subcutaneous neurons in the Atlantic hagfish Myxine glutinosa. *Acta Zool.* **2015**, *96*, doi:10.1111/azo.12068.

211. Lauriano, E.R.; Pergolizzi, S.; Gangemi, J.; Kuciel, M.; Capillo, G.; Aragona, M.; Faggio, C. Immunohistochemical colocalization of G protein alpha subunits and 5-HT in the rectal gland of the cartilaginous fish Scyliorhinus canicula. *Microsc. Res. Tech.* **2017**, *80*, doi:10.1002/jemt.22896.

212. Ellis, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 2001.

213. Nagashima, Y.; Kikuchi, N.; Shimakura, K.; Shiomi, K. Purification and characterization of an antibacterial protein in the skin secretion of rockfish Sebastes schlegeli. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2003**, doi:10.1016/S1532-0456(03)00174-1.

214. Kuppulakshmi, C.; Prakash, M.; Gunasekaran, G.; Manimegalai, G.; Sarojini, S. Antibacterial properties of fish mucus from Channa punctatus and Cirrhinus mrigala. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2008**.

215. Su, Y. Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (Pelteobagrus fulvidraco). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* **2011**, doi:10.1016/j.cbpb.2010.11.002.

216. Wei, O.Y.; Xavier, R.; Marimuthu, K. Screening of antibacterial activity of mucus extract of snakehead fish, Channa striatus (Bloch). *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2010**.

217. Chinchar, V.G.; Bryan, L.; Silphadaung, U.; Noga, E.; Wade, D.; Rollins-Smith, L. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides. *Virology* **2004**, doi:10.1016/j.virol.2004.02.029.

218. Aranishi, F.; Mano, N.; Nakane, M.; Hirose, H. Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. *Fish Physiol. Biochem.* **1998**, doi:10.1023/A:1007746514851.

219. Patrzykat, A.; Zhang, L.; Mendoza, V.; Iwama, G.K.; Hancock, R.E.W. Synergy of histone-derived peptides of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, doi:10.1128/AAC.45.5.1337-1342.2001.

220. Roosta, Z.; Hajimoradloo, A.; Ghorbani, R.; Hoseinifar, S.H. The effects of dietary vitamin C on mucosal immune responses and growth performance in Caspian roach (Rutilus rutilus caspicus) fry. *Fish Physiol. Biochem.* **2014**, *40*, 1601–1607, doi:10.1007/s10695-014-9951-6.

221. Bui, H.T.D.; Khosravi, S.; Fournier, V.; Herault, M.; Lee, K.J. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (Pagrus major) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture* **2014**, *418–419*, 11–16, doi:10.1016/j.aquaculture.2013.09.046.

222. Gabrielsen, B.O.; Austreng, E. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, Salmo salar L., fed wet feed with alginate. *Aquac. Res.* **1998**, *29*, 397–401, doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00215.x.

223. Valdes, L.; Peterson, W.; Church, J.; Brander, K.; Marcos, M. Our changing oceans: conclusions of the first International Symposium on the Effects of climate change on the world's oceans. *ICES J. Mar. Sci.* **2009**, doi:10.1093/icesjms/fsp134.

224. Poli, A.; Anzelmo, G.; Nicolaus, B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Mar. Drugs* 2010.

225. Papaleo, M.C.; Romoli, R.; Bartolucci, G.; Maida, I.; Perrin, E.; Fondi, M.; Orlandini, V.; Mengoni, A.; Emiliani, G.; Tutino, M.L.; Parrilli, E.; de Pascale, D.; Michaud, L.; Lo Giudice, A.; Fani, R. Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria. *N. Biotechnol.* **2013**, doi:10.1016/j.nbt.2013.03.011.

226. Gugliandolo, C.; Lentini, V.; Spanò, A.; Maugeri, T.L. New bacilli from shallow hydrothermal vents of Panarea Island (Italy) and their biotechnological potential. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05272.x.

227. Gugliandolo, C.; Spanò, A.; Maugeri, T.; Poli, A.; Arena, A.; Nicolaus, B. Role of Bacterial Exopolysaccharides as Agents in Counteracting Immune Disorders Induced by Herpes Virus. *Microorganisms* **2015**, doi:10.3390/microorganisms3030464.

228. Dias, D.A.; Urban, S.; Roessner, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2012.

229. Zhu, D.; Wen, X.; Xuan, X.; Li, S.; Li, Y. The green alga Ulva lactuca as a potential ingredient in diets for juvenile white spotted snapper Lutjanus stellatus Akazaki. *J. Appl. Phycol.* **2016**, doi:10.1007/s10811-015-0545-1.

230. Ragaza, J.A.; Koshio, S.; Mamauag, R.E.; Ishikawa, M.; Yokoyama, S.; Villamor, S.S. Dietary supplemental effects of red seaweed Eucheuma denticulatum on growth performance, carcass composition and blood chemistry of juvenile Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. *Aquac. Res.* **2015**, doi:10.1111/are.12211.

231. Mendoza Rodriguez, M.G.; Pohlenz, C.; Gatlin, D.M. Supplementation of organic acids and algae extracts in the diet of red drum Sciaenops ocellatus: immunological impacts. *Aquac. Res.* **2017**, doi:10.1111/are.13015.

232. Subhra Bikash, K.M. Seaweed Incorporated Diet Improves Astaxanthin Content of Shrimp Muscle Tissue. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* **2015**, doi:10.4172/2155-9910.1000161.

233. Hoseinifar, S.H.; Yousefi, S.; Capillo, G.; Paknejad, H.; Khalili, M.; Tabarraei, A.; Van Doan, H.; Spanò, N.; Faggio, C. Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defence related genes expression and growth performance of zebrafish (Danio rerio) fed on Gracilaria gracilis powder. *Fish Shellfish Immunol.* **2018**, doi:10.1016/j.fsi.2018.09.046.

234. Casalduero, F.G.; Marina, U.D.B.; Ciencias, D.; Naturales, R. Integrated systems : " Environmentally clean " aquaculture. *Self* **1999**.

235. Messyasz, B.; Leska, B.; Fabrowska, J.; Pikosz, M.; Roj, E.; Cieslak, A.; Schroeder, G. Biomass of freshwater Cladophora as a raw material for agriculture and the cosmetic industry. *Open Chem.* **2015**, doi:10.1515/chem-2015-0124.

236. Saber, M.; Nakhshiniev, B.; Yoshikawa, K. A review of production and upgrading of algal

bio-oil. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2016.

237. Al-Amoudi, O.A.; Mutawie, H.H.; Patel, A. V.; Blunden, G. Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah corniche algae, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* **2009**, doi:10.1016/j.sjbs.2009.07.004.

238. D'Ayala, G.G.; Malinconico, M.; Laurienzo, P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. *Molecules* 2008.

239. Pangestuti, R.; Kim, S.-K. Neuroprotective effects of marine algae. *Mar. Drugs* **2011**, doi:10.3390/md9050803.

240. Pérez, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Mar. Drugs* 2016.

241. Marino, F.; Di Caro, G.; Gugliandolo, C.; Spanò, A.; Faggio, C.; Genovese, G.; Morabito, M.; Russo, A.; Barreca, D.; Fazio, F.; Santulli, A. Preliminary study on the in vitro and in vivo effects of Asparagopsis taxiformis bioactive phycoderivates on teleosts. *Front. Physiol.* **2016**, doi:10.3389/fphys.2016.00459.

242. Minicante, S.A.; Michelet, S.; Bruno, F.; Castelli, G.; Vitale, F.; Sfriso, A.; Morabito, M.; Genovese, G. Bioactivity of phycocolloids against the mediterranean protozoan Leishmania infantum: An inceptive study. *Sustain.* **2016**, doi:10.3390/su8111131.

243. Bansemir, A.; Blume, M.; Schröder, S.; Lindequist, U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* **2006**, doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.051.

244. Vatsos, I.N.; Rebours, C. Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. *J. Appl. Phycol.* **2015**, doi:10.1007/s10811-014-0506-0.

245. Perry, N.B.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.G. A cytotoxic and antifungal 1,4-Naphthoquinone and related compounds from a new zealand brown alga, landsburgia quercifolia. *J. Nat. Prod.* **1991**, doi:10.1021/np50076a009.

246. Harada, H.; Noro, T.; Kamei, Y. Selective Antitumor Activity in Vitro from Marine Algae from Japan Coasts. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, doi:10.1248/bpb.20.541.

247. Francisco, M.E.Y.; Erickson, K.L. Ma'iliohydrin, a cytotoxic chamigrene dibromohydrin from a Philippine Laurencia species. *J. Nat. Prod.* **2001**, doi:10.1021/np0005053.

248. Smit, A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* 2004, *16*, 245–262.

249. Vlachos, V.; Critchley, A.T.; Von Holy, a. Establishment of a protocol for testing antimicrobial activity in southern African macroalgae. *Microbios* **1996**.

250. Val, A.G. Del; Platas, G.; Basilio, A.; Cabello, A.; Gorrochategui, J.; Suay, I.; Vicente, F.; Portillo, E.; Río, M.J. Del; Reina, G.G.; Peláez, F. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.* **2001**, doi:10.1007/s101230100006.

251. Ozdemir, G.; Karabay, N.U.; Dalay, M.C.; Pazarbasi, B. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of Spirulina platensis. *Phyther. Res.* **2004**, doi:10.1002/ptr.1541.

252. Karabay-Yavasoglu, N.U.; Sukatar, A.; Ozdemir, G.; Horzum, Z. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga Jania rubens. *Phytother. Res.* **2007**, doi:10.1002/ptr.2045.

253. Cavallo, R.A.; Acquaviva, M.I.; Stabili, L.; Cecere, E.; Petrocelli, A.; Narracci, M. Antibacterial activity of marine macroalgae against fish pathogenic *Vibrio* species. *Cent. Eur. J. Biol.* **2013**, doi:10.2478/s11535-013-0181-6.

254. Earl, A.M.; Losick, R.; Kolter, R. Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends Microbiol.* 2008.

255. Logan, N.A. Bacillus species of medical and veterinary importance. *J. Med. Microbiol.* 1988.

256. Gill, D.M. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* **1982**.

257. Wang, T.; Jónsdóttir, R.; Ólafsdóttir, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* **2009**, doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.041.